

T.C.  
FIRAT ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
MİKROBİYOLOJİ VE KLİNİK MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**HEMODİYALİZ, PERİTON DİYALİZİ VE PREDİYALİZ HASTALARDA  
GİZLİ HEPATİT B ENFEKSİYONUNUN POLİMERAZ ZİNCİR (PZR)  
REAKSİYONU YÖNTEMİ İLE ARAŞTIRILMASI**

Uzmanlık Tezi  
Dr. Mürüvvet DOĞUKAN

Tez Danışmanı  
Prof. Dr. Mustafa YILMAZ

ELAZIĞ - 2007

## DEKANLIK ONAYI

Prof. Dr. Ömer Lütfi ERHAN

\_\_\_\_\_

Dekan

Bu tez Uzmanlık Tezi standartlarına uygun bulunmuştur.

Prof. Dr. Zülal Aşçı TORAMAN

\_\_\_\_\_

Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Uzmanlık Tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Mustafa YILMAZ

\_\_\_\_\_

Danışman

Uzmanlık Jüri Üyeleri

.....

\_\_\_\_\_

.....

\_\_\_\_\_

.....

\_\_\_\_\_

.....

\_\_\_\_\_

.....

\_\_\_\_\_

Bu tez, Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (FÜBAP) yönetim birimi Başkanlığı tarafından 1289 (2006/2-9, Tıpta Uzmanlık) no'lu proje ile desteklenmiştir.

## TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimime katkıda bulunan, tez danışmanım Prof. Dr. Mustafa Yılmaz'a, Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Zülal Aşçı Toraman'a, öğretim üyeleri Prof. Dr. Adnan Seyrek, Doç. Dr. Ahmet Kizirgil, Yrd. Doç. Dr. Yasemin Bulut'a, aynı ortamda çalıştığım araştırma görevlisi ve personel arkadaşlarıma, ihtisas yapmam için beni yüreklendiren ve bana her zaman destek olan anneme, babama, çocuklarıma ve tez çalışmamın her aşamasında yardımcı olan eşim Nefroloji Bilim Dalı Öğretim Üyesi Doç.Dr. Ayhan Doğukan'a teşekkür ediyorum.

## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
<b>TEŞEKKÜR</b> .....	iv
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	v
<b>TABLO LİSTESİ</b> .....	vii
<b>ŞEKİL LİSTESİ</b> .....	viii
<b>KISALTMALAR LİSTESİ</b> .....	ix
<b>1. ÖZET</b> .....	1
<b>2. ABSTRACT</b> .....	2
<b>3. GİRİŞ</b> .....	3
3.1. Hepatit B Virusu .....	4
3.1.1 Hepatit B Virusunun Tarihçesi .....	4
3.1.2 Hepatit B Virusunun Yapısı .....	5
3.1.3 Viral Genomun Yapısı .....	7
3.1.4 Viral Proteinler .....	9
3.1.5 Viral Replikasyon .....	12
3.1.6 HBV Genotipleri .....	16
3.1.7 HBV Mutasyonları .....	18
3.2. Hepatit B Virusunun Epidemiyolojisi .....	21
3.2.1. Hepatit B Virusunun Bulaş Yolları .....	21
3.2.2. Hepatit B Virus Enfeksiyonunun Prevalansı .....	23
3.3. Hepatit B Virus Enfeksiyonu .....	23
3.3.1. Hepatit B Virus Enfeksiyonunun Tanısı .....	25

3.4.	Gizli Hepatit B Virus Enfeksiyonu .....	28
3.4.1	Gizli Hepatit B Virus Enfeksiyonunda Seroloji ve Moleküler İnceleme	32
<b>4.</b>	<b>GEREÇ VE YÖNTEM .....</b>	<b>34</b>
4.1.	Hastaların Seçimi .....	34
4.2	Örneklerin Toplanması ve Analize Hazırlanması .....	34
4.3.	Kimyasal Maddeler, Sarf Malzemeleri ve Cihazlar .....	35
4.4.	DNA İzolasyonu .....	36
4.5.	Polimeraz Zincir Reaksiyonu .....	37
4.6.	Agaroz Jel Elektroforezi .....	38
4.7	İstatistiksel Analiz .....	38
<b>5.</b>	<b>BULGULAR .....</b>	<b>39</b>
<b>6.</b>	<b>TARTIŞMA .....</b>	<b>44</b>
<b>7.</b>	<b>KAYNAKLAR .....</b>	<b>54</b>
<b>8.</b>	<b>ÖZGEÇMİŞ .....</b>	<b>65</b>

## TABLO LİSTESİ

### Sayfa No

<b>Tablo 1.</b> Enfeksiyonun tanısında ve izlenmesinde kullanılan serolojik göstergeler .....	26
<b>Tablo 2.</b> Hastaların genel özellikleri .....	39
<b>Tablo 3.</b> Grupların genel özelliklerinin karşılaştırılması .....	40
<b>Tablo 4.</b> Hasta grupları arasında hepatit belirleyicilerinin karşılaştırılması .....	41
<b>Tablo 5.</b> Gizli hepatit B pozitif ve negatif hastaların genel özellikleri .....	43

## ŞEKİL LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1. HBV virionunun şematik yapısı .....	7
Şekil 2. HBV genomik organizasyonu ve sentezlenen RNA'lar .....	14
Şekil 3. HBV replikasyonunun şematik görünümü .....	16
Şekil 4. HBV DNA pozitif örneklere ait PZR ürünlerinin (259 bç) %2'lik agaroz jel görüntüsü .....	42



## KISALTMALAR LİSTESİ

<b>ALT</b>	: Alanin aminotransferaz
<b>anti-HBc</b>	: Hepatit B kor antijenine karşı gelişen antikor
<b>anti-HBe</b>	: Hepatit B “e” antijenine karşı gelişen antikor
<b>anti-HBs</b>	: Hepatit B yüzey antijenine (s antijeni) karşı gelişen antikor
<b>AST</b>	: Aspartat aminotransferaz
<b>Bç</b>	: Baz çifti
<b>cccDNA</b>	: Covalently closed circular DNA
<b>CRP</b>	: C-reaktif protein
<b>DNA</b>	: Deoksiribonükleik asit
<b>DR</b>	: Direct Repeats
<b>ELISA</b>	: Enzyme-Linked Immunosorbent Assays
<b>HBcAg</b>	: Hepatit B kor antijeni
<b>HBeAg</b>	: Hepatit B “e” antijeni
<b>HBsAg</b>	: Hepatit B yüzey antijeni
<b>HBV</b>	: Hepatit B virusu
<b>HCV</b>	: Hepatit C virusu
<b>HIV</b>	: Human Immunodeficiency Virus
<b>HSK</b>	: Hepatosellüler karsinom
<b>KAH</b>	: Kronik aktif hepatit
<b>kD</b>	: Kilo Dalton
<b>KPH</b>	: Kronik persistan hepatit
<b>LHBs</b>	: Large Hepatitis B surface antigen
<b>MHBS</b>	: Medium Hepatitis B surface antigen

<b>mM</b>	: Milimol
<b>µl</b>	: Mikrolitre
<b>mRNA</b>	: Messenger RNA
<b>nm</b>	: Nanometre
<b>ORF</b>	: Open reading frame
<b>PCR</b>	: Polymerase chain reaction
<b>pgRNA</b>	: Pregenomik RNA
<b>PKMH</b>	: Periferik kan mononükleer hücreler
<b>PZR</b>	: Polimeraz zincir reaksiyonu
<b>rcDNA</b>	: Relaxed-circular, partially double-stranded DNA
<b>RIA</b>	: Radioimmunoassay
<b>RNA</b>	: Ribonükleik asit
<b>SHBs</b>	: Small Hepatitis B surface antigen

## 1. ÖZET

Serumda hepatit B yüzey antijeninin (HBsAg) negatif olduğu durumlarda, hepatit B virusu DNA (HBV-DNA)'sının varlığı gizli hepatit B olarak bilinmektedir. Gizli hepatit B'nin prevalansı tam olarak bilinmemesine rağmen, hemodiyaliz tedavisi uygulanan hastalarda daha sık olduğunu bildiren çok sayıda araştırma vardır. Bu çalışmada, hemodiyaliz ve periton diyalizi hastaları ile kronik böbrek yetersizliği olup henüz diyaliz tedavisi başlanmamış hastalarda gizli hepatit B prevalansı araştırıldı.

Çalışmaya HBsAg-negatif olan toplam 174 hasta alındı. Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) yöntemi ile hemodiyaliz hastalarının %2.6'sında, periton diyalizi hastalarının %1.8'inde HBV-DNA varlığı saptandı. Buna karşılık, henüz diyaliz tedavisine başlanmamış kronik böbrek yetersizliği olan hastalarda gizli hepatit B enfeksiyonu saptanmadı (%0). Gizli HBV enfeksiyonu saptanan hastalarla diğer hastalar arasında karaciğer enzimlerinin yüksekliği ve serum CRP seviyesi yönünden anlamlı düzeyde farklılık saptanmadı ( $p>0.05$ ).

Sonuç olarak, çalışmamızda hemodiyaliz uygulanan hastalarda gizli HBV enfeksiyonu varlığının düşük sıklıkla olsa da görülebileceği saptanmıştır. Hem hemodiyaliz hem de periton diyalizi uygulanan hastalara cihaz kaynaklı HBV bulaşımını önlemek için sadece serolojik testlerle virüs varlığının araştırılmasının yeterli olamayacağı, dolayısıyla, PZR gibi duyarlılığı daha yüksek testlerle bu hastaların taranmasının uygun olabileceği düşünülmüştür.

**Anahtar Kelimeler:** Hemodiyaliz, peritoneal diyaliz, prediyaliz, gizli hepatit B, polimeraz zincir reaksiyonu (PZR)

## 2. ABSTRACT

### THE INVESTIGATION OF OCCULT HEPATITIS B INFECTION IN HEMODIALYSIS, PERITONEAL DIALYSIS, AND PREDIALYSIS PATIENTS BY POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR) METHOD.

The presence of hepatitis B virus DNA in case of negative hepatitis B surface antigen in serum is known as occult hepatitis B. Although their exact prevalence is not known, there are many reports indicating that occult hepatitis B are more frequently encountered in patients undergoing hemodialysis treatment. The aim of this study was to investigate the prevalence of occult hepatitis B in patients with hemodialysis, peritoneal dialysis, and predialytic chronic renal failure.

A total of 174 HBsAg-negative sera were included to the study. HBV-DNA was detected by polymerase chain reaction (PCR) in 2.6% of hemodialysis patients and 1.8% of peritoneal dialysis patients. In contrast, there was no occult hepatitis B virus infection in non-dialyzed patients with chronic renal failure. According to the liver enzymes and serum CRP levels, there was no statistically difference ( $p>0.05$ ) between the occult hepatitis B positive patients and the negative patients.

In conclusion, although it was a low rate, the occult hepatitis B infections was detected among dialysis patients in our study. Therefore, in spite of serologic analysis, both hemodialysis and peritoneal dialysis patients should be screened for occult HBV infections by a more sensitive test such as PCR, in order to prevent the dialysis-mediated transmission risk of HBV infection.

**Key Words:** Hemodialysis, peritoneal dialysis, predialysis, occult hepatitis B, polymerase chain reaction (PCR)

### 3. GİRİŞ

Hepatit B virusu (HBV), kronik karaciğer hastalığının en önemli nedenlerinden biri olup, tüm dünyada ciddi bir morbidite ve mortalite sebebidir (1). Hepatit B virusu enfeksiyonunun seyri son derece değişkendir. Hastalar asemptomatik olarak enfeksiyonu geçirebilir veya akut hepatit gelişebilir. Akut hepatit ise tamamen iyileşebilir veya %20–40 oranında siroz, primer hepatoselüler karsinom (HSK) veya kronik karaciğer hastalığı olarak ortaya çıkabilir (2).

Tüm dünyada 400 milyonu aşkın sayıda kişinin HBV taşıyıcısı olduğu ve her yıl global olarak izlenen 530.000 hepatoselüler karsinom olgusunun 316.000'inin HBV ile ilişkili olduğu bildirilmektedir. Ayrıca her yıl dünyada 1.000.000'a yaklaşan sayıda kişi, HBV enfeksiyonu ile ilgili komplikasyonlardan kaybedilmektedir. Günümüzde; uygulandığında korunmada yüksek oranda etkili olabilen bir aşısı olan HBV enfeksiyonu, bütün dünyada ciddi bir halk sağlığı sorunu olarak önemini sürdürmektedir (3).

Hepatit B virusu enfeksiyonunun iyileşmesi, Hepatit B yüzey antijeni'nin (HBsAg) kaybolması ile birlikte serumda HBV-DNA'nın negatifleşmesi ve Hepatit B yüzey antikorlarının (anti-HBs) pozitifliği olarak tanımlanmaktadır. Enfeksiyonun belirlenmesinde serolojik göstergelerin saptanması önemli olmakla birlikte, yetersiz de kalabilmektedir. Kendiliğinden veya tedavi ile serolojik olarak HBsAg'si kaybolan bazı hastalarda serum ve/veya karaciğerde hassas PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) teknikleri ile düşük düzeyde HBV DNA varlığı gösterilmiştir (4). Böylece saptanamayan HBsAg ile birlikte kronik HBV enfeksiyonunu tanımlayan bu yeni durum gizli (okült), sessiz veya latent HBV enfeksiyonu olarak adlandırılmaktadır (5). Okült HBV enfeksiyonlarının, kriptojenik hepatit ve

hepatosellüler karsinom (HSK) olgularında daha sık gözleendiği bildirilmekle birlikte, enfeksiyonun gizli bir seyir göstermesinde hepatit C virus (HCV) veya Human Immunodeficiency Virus (HIV) ile ko-enfeksiyonların, hemodiyaliz ve transplantasyon uygulamaları ve intravenöz ilaç bağımlılığı gibi faktörlerin etkili olabildiği ifade edilmiştir (5,6). Buna karşın, HBsAg negatif, anti-HBc ve/veya anti-HBs pozitif olan ve enfeksiyonu geçirdiği düşünülen kişilerin bir kısmının yanı sıra, HBV göstergeleri negatif sağlıklı kişilerde de HBV-DNA pozitifliğinin saptanması, gerek klinik gerekse laboratuvar değerlendirmelerinde sorunlara yol açmaktadır (7).

Bugünkü yeni değerlendirmelerin ışığı altında, PZR gibi hassas testlerin gelişmesi ile gizli HBV enfeksiyonu tanımlaması yapılmıştır. Serolojik göstergeleri negatif olgularda, HBV enfeksiyonunun kesin tanısı için en duyarlı yöntemlerden biri olarak HBV-DNA'nın incelenmesi önerilmektedir (8). Bu klinik durumu saptamada anahtar, HBV-DNA'nın saptanması olduğu için, bu işlemde kullanılan teknik ve standardizasyonu gizli HBV sıklığını etkilemektedir. Ayrıca, HBV'nin coğrafik dağılımı ve risk faktörlerinin varlığı da gizli HBV prevalansını etkileyen diğer durumlardır. Gizli HBV enfeksiyonunun patogenezi ve klinik öneminin belirlenmesi için geniş çaplı çalışmalara gereksinim vardır.

Bu çalışmada hemodiyaliz, periton diyalizi ve prediyaliz hastalarında gizli HBV varlığının PZR ile tanımlanması amaçlanmıştır.

### **3.1. HEPATİT B VİRUSU**

#### **3.1.1. Hepatit B Virusunun Tarihçesi**

İlk kez 1963 yılında Blumberg ve ark., polimorfik serum proteinleri konusunda yaptıkları çalışmayı yürütürken bir Avustralya yerlisinin kanında o güne kadar tanımlanmamış yeni bir antijenin varlığını gözlemlemişlerdir. "Avustralya

antijeni” adı verilen bu protein, günümüzde “HBsAg” olarak adlandırılmaktadır. Bu antijenler akut hepatit B’li hastalarda saptanmış ve bunların tip B hepatiti ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (9).

1970 yılında ise Dane ve ark., immün elektron mikroskopi tekniğini kullanarak inceledikleri hasta serumlarında yüzeylerinde aynı antijeni (Avustralya antijeni) taşıyan virus benzeri partikülleri saptamışlar ve bu partiküllerin HBV olduğunu ileri sürerek “Dane Partikülü” adını vermişlerdir (10). Dane partikülünde yüzey antijeni dışında ayrıca bir çekirdek antijeni de bulunduğu gösterilmiş, bunu izleyen yıllarda çeşitli çalışmalarla virusun genomik yapısı ve proteinleri karakterize edilmiştir (11).

### **3.1.2. Hepatit B Virusunun Yapısı**

Hepatit B virusu, kanatlı ve memelilerde enfeksiyon oluşturan, genom organizasyonu, doku tropizmi ve replikasyon stratejileri açısından birbirine benzerlikler gösteren çeşitli viruslardan oluşan *Hepadnaviridae* ailesinde yer almaktadır. Hepatit B virusu, bu ailenin Orthohepadnavirus cinsinde yer alan prototip bir virustur. İnsan ve şempanzelerin karaciğerinde enfeksiyon oluşturur. Ördekler, ağaçkakanlar ve sincaplarda da Hepatit B virüsleri tarif edilmiştir. Bu virüsler da temel olarak hepatotropik virüslardır. Buldukları konakta persistan enfeksiyonlara, karaciğer kanserine neden olurlar. Çalışmalarda, ağaçkakan ve kaz hepatit virüsleri sıklıkla hayvan hepatit modelleri olarak kullanılırlar (12).

Hepatit B virusunun yapısını araştırmak amacıyla; akut ve kronik hepatit hastalarının serumları ultrasantrifugasyon işlemini takiben yapılan elektron mikroskopik incelemelerde büyüklük, yapı ve miktar gibi özellikler açısından birbirine benzemeyen üç farklı viral partikül varlığı saptanmıştır (11).

1-Dane Partikülleri: 42 nm (42–47) çapında, tam bir virion yapısında, küresel şekilli enfeksiyöz partiküllerdir.

2-Küresel (sferik) Partiküller: 22 nm (16-25 nm) çapında, nükleik asit içermeyen, enfeksiyöz olmayan partiküllerdir.

3-Tubuler (filamentöz) Partiküller: 22 nm (16-25 nm) çapında, 100–500 nm uzunluğunda, içinde nükleik asit bulunmayan ve özellikle replikasyonun söz konusu olduğu kişilerin serumunda bulunan enfeksiyöz olmayan partiküllerdir.

Her üç tip partikülün de anti-HBs antikorları ile reaksiyon vermesi, tümünün yapısında HBs antijeni denilen ortak yüzey antijeninin bulunduğunu gösterir. Hepatit B virusu yüzey antijeni 24 kD büyüklüğünde bir protein olup, glikozillenmiş veya glikozillenmemiş şekilde bulunabilir. Hepatit B virusu ile enfekte bireylerin serumlarında bol miktarda enfeksiyon oluşturmeyen HBsAg saptanır. Aşı üretiminde özellikle enfeksiyon oluşturmeyen 22 nm'lik HBsAg yapıları kullanılır (13). 22 nm'lik partiküllerin tamamı yüzey antijeninden oluşurken, Dane partiküllerinin sadece 7 nm kalınlığındaki dış bölgesi, lipid tabakası içine integre olmuş yüzey antijeninden meydana gelir. Bu tabakanın altında ise 25-27 nm çapındaki “Kor Bölgesi” bulunur. Akut hepatit B olgularında saptanan anti-HBc (Hepatit B kor antikor) ile de bu bölgenin reaksiyon verdiği belirlenmiştir. Günümüzde HBcAg (Hepatit B kor antijeni) adı verilen bu bölgenin, kılıf tabakasından farklı bir antijenik yapıya sahip olduğu bilinmektedir. Nükleokapsit bölgesi, HBcAg özelliğinin yanı sıra bu antijenin yapısal değişikliğe uğramış şekli olan HBeAg (Hepatit B e antijeni) özelliğini de taşır. Kor bölgesi bu iki antijenin dışında, virus DNA'sını, DNA polimeraz enzimini ve DNA'ya kovalent bağlarla birleşmiş bir polipeptidi de içerir. Enfektif özellikte olmayan formlar Dane partikülüne göre daha fazla üretilir (%85).

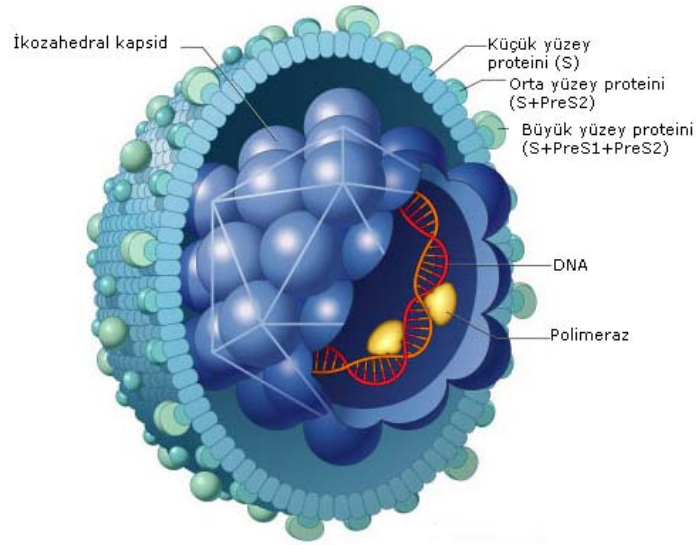


Dane partiküllerinin sayısı  $10^4$ - $10^9$ /ml arasında iken, enfeksiyöz olmayan küresel partiküllerin sayısının  $10^{13}$ /ml veya daha fazla olduğu bildirilmiştir (11,14).

Hepatit B virusu,  $30$ - $32^{\circ}\text{C}$ 'de saklandığında en az altı ay,  $-20^{\circ}\text{C}$ 'de ise 15 yıl enfektivitesini kaybetmemektedir. Zarflı bir virus olmasına rağmen, eter, düşük pH etkisinde 6 saat,  $98^{\circ}\text{C}$ 'de bir dakika veya  $60^{\circ}\text{C}$ 'de 10 saat enfektivitesi devam etmektedir. Bu özellikler virusun kişiden kişiye geçişteki etkinliğine katkıda bulunur ve dezenfektanlara direncini sağlar (15).

### 3.1.3. Viral Genomun Yapısı

Hepatit B virusu, bilinen hayvan virusları içinde en küçük genoma sahip olan zarflı bir DNA virusudur. Diğer DNA viruslarından farklı bazı özelliklere sahiptir. Viral genom kısmen çift ( $\approx$  %70) kısmen de tek ( $\approx$  %30) iplikli, çembersel DNA'dan oluşur ve DNA'yı ikozahedral bir kapsid çevreler. Bunun dışında da üç farklı yüzey antijenini taşıyan lipid yapılı zarf yer alır (Şekil 1) (14,16).



Şekil 1. HBV virionunun şematik yapısı (16)

Virus proteinlerini kodlayan uzun zincir (L veya negatif zincir) 3200 nükleotid taşır ve tam bir halka oluşturur. Daha kısa olan zincirin (S veya pozitif zincir) uzunluğu ise değişkendir (1800–2700 nükleotid). Bu nedenle DNA molekülünün bir kısmı tek sarmalıdır. Bu zincirler ortak baz çiftlerine sahip olup, sirküler bir yapı halinde bulunmakla birlikte, 3' ve 5' uçları ile birbirleriyle birleşemediklerinden gerçekte lineer moleküllerdir. Hepatit B virusu DNA'sının çembersel şekildeki yapısal bütünlüğü her iki zincirin 5' uçlarından birbirlerine hidrojen bağları ile tutunmaları sonucu gerçekleşir. Bu bölgeler 10–12 nükleotidlik yinelenen dizinlerden meydana gelmiş sabit bölgeler olup, DR (Direct Repeats) olarak adlandırılırlar. Hepatit B virusunda iki adet DR (DR1 ve DR2) bulunur. Negatif iplikçiğin 5' ucunda kovalen bağlanmış viral polimeraz ve pozitif iplikçiğin 5' ucunda kovalen bağlanmış oligonükleotid RNA bulunur. Viral genomun bu yapısı gevşek sirküler DNA (rcDNA= relaxed-circular, partially double –stranded DNA) olarak adlandırılmaktadır (11).

Hepatit B virusunun kodlanmış genetik bilgisinin tümü negatif sarmal üzerindedir. Sarmal üzerinde 4 tane açık okuma alanı (ORF=open reading frame) vardır. Bunlar S, C, X ve P bölgeleridir. Bu dört gen bölgesi birbiri ile iç içedir. Genomun en uzun geni olan P geni X ve C geni ile kısmen, S geni ile tamamen çakışmış durumdadır. Bu şekilde uzun sarmal 1.5 defa okunur. HBV'nin S geni; virionu çevreleyen yüzey proteinlerini, C geni; kapsid proteinlerini, X geni; X proteinini ve P geni de; revers transkriptaz aktivitesine sahip DNA polimerazı kodlar. Gen üzerinde bulunan her bölge (S geni üzerindeki pre-S1, pre-S2 ile C geni üzerindeki pre-C ve C bölgeleri) için farklı başlangıç kodonları bulunmaktadır. Bu şekilde birbiri ile ilişkili, birden fazla proteinin sentezi sağlanmış olur (14). Hepatit B virusu, dört adet ORF'ya sahip olmasına rağmen yedi değişik polipeptit

üretebilmektedir (LHBs, MHBs, SHBs, HBeAg, HBcAg, DNA polimeraz ve HBxAg) (3).

#### **3.1.4. Viral Proteinler**

**Yüzey proteinleri:** S geni tarafından büyük yüzey proteini (LHBs-Large HBs), orta yüzey proteini (MHBs-Medium HBs) ve küçük yüzey proteini (SHBs-Small-HBs) olmak üzere üç adet yüzey proteini sentezlenir. Bu proteinler hem Dane partiküllerinin yüzeyinde hem de enfekte hastaların karaciğer ve serumlarında belirlenen 22 nm çapındaki küresel ve tübüler partiküllerin yapısında bulunurlar (14,16).

**LHBs:** S geninde okuma ilk kodondan (pre S1) başlarsa pre-S1, pre-S2 ve S gen bölgelerinin tümü okunur ve gen ürünü olarak büyük yüzey proteini sentezlenir. Bu proteinin virionun konak hücreye bağlanmasında rolü olduğu düşünülmektedir. En fazla Dane partiküllerinin yüzeyinde bulunur. Tübüler partiküllerin kılıfında da bulunur. Fakat sferik partiküllerde miktarı oldukça azdır. Dane partikülünün oluşumu ve konak hücreden salınımı için LHBs ve SHBs'nin sentezlenmiş olması şarttır, MHBsAg ise şart değildir (17). LHBs/SHBs oranı hepatositlerde oluşan partikülün şeklini belirler. LHBs'nin hepatositlerde lezyon oluşumu ve HSK gelişimi ile ilgili rolü olduğuna inanılmaktadır. Ayrıca kor partiküllerinin kılıflanabilmesi için de LHBs'ye ihtiyaç vardır (18).

**MHBs:** Orta yüzey proteindir. Okumanın ikinci kodondan başlaması ve pre-S2 ve S gen bölgelerinin okunmasıyla oluşur. Her 3 partikülde minör komponenttir. HBV'nin hepatositlere tutunmasında görev aldığı düşünülmektedir. Replikasyon olmadığı durumda HBsAg içinde bulunmaz. Bu nedenle MHBsAg mevcudiyeti viral replikasyonun bir göstergesi olarak kabul edilir. Enfeksiyonun erken döneminde

LHBs ve MHBs'nin ortaya çıktığı gösterilerek bu proteinlere karşı gelişen antikor varlığının iyileşmenin göstergesi olduğu kabul edilmiştir (19).

**SHBs:** Kılıfın küçük proteinidir. Gen üzerinde sadece S bölgesinin okunmasıyla sentezlenir. HBsAg'nin büyük kısmını oluşturan major proteinidir ve 3 partikül tipinde de baskın olarak bulunur. Kanda oluşan S geni ürünlerinin %5-15'i MHBs, %1-2'si LHBs, geri kalanını da SHBs oluşturur (14,20).

**Kor proteinleri:** Hepatit B virusunun C geni; pre-C ve C olmak üzere iki ayrı bölgeye sahiptir. Okuma işleminin başlangıç bölgesine göre iki farklı protein sentezlenir. Okuma işlemi pre-C'den başlarsa her iki bölge (pre-C ve C) de okunur ve HBeAg proteini sentezlenir. C bölgesinden başlarsa HBcAg proteini sentezlenir (20). HBcAg sentezlendikten sonra endoplazmik retikuluma gidemez ve konak hücre sitoplazmasında kalır. 21.5 kD'luk HBcAg, viral DNA'yı, viral polimeraz ve ribonükleaz H'ı çevreler. Viral DNA'ya sıkıca bağlanır. Bu nedenle, anti-HBc ile reaksiyona girebilmesi için kor partiküllerinin parçalanıp, serbest polipeptit zincirlerinin açığa çıkması gerekir. HBcAg intranükleer yerleşimli olup ancak aktif hastalık döneminde ve aşırı replikasyon gösteren olgularda sitoplazmada yaygın olarak belirlenebilir ya da doğal enfeksiyon seyri esnasında çok kısa bir süre için serumda serbest halde bulunabilir. Fakat anti-HBc ile hızla birleşir ve kompleks oluşturur. HBcAg hücre dışı ortama sekrete edilmez. Bu nedenle, dolaşımında HBcAg tespit edilemediği için tanı amacıyla da kullanılamaz (3,16,21).

Okuma Pre-C'den başladığı zaman hem pre-C hem de C bölgesi okunur ve HBeAg sentezlenir. Oluşan ürün, N terminal ucundaki 29 aminoasitlik bölüm dışında HBcAg sekansı ile tamamen aynıdır. Bu bölüm sayesinde endoplazmik retikuluma girer ve bir peptidaz tarafından karboksiterminal ucundaki 34 aminoasitlik bölümü kesintiye uğratıldıktan sonra işlenmiş bir protein olarak golgi cisimciği üzerinden

HBeAg olarak sekrete edilir (3,19). HBeAg, yapısal bir protein değildir, hepatositin dış yüzeyinde ve serumda çözünür halde bulunur. Spesifik olarak serum albumini, immünglobulin ve alfa-antitripsine bağlanır. Anti-HBe'ye bağlanabilir, fakat anti-HBc ile reaksiyona girmez. Fonksiyonu tam olarak bilinmemekle birlikte devam eden bir viral replikasyonun göstergesi olduğu düşünülmektedir. Ancak yapılan bazı çalışmalar, replikasyon için gerekli olmadığı ve anti-HBe ile birlikte vireminin saptanmasında güvenilir parametre olamayacağını düşündürmüştür (3,18, 22). Çünkü prekor bölgesindeki mutasyonlar sonucu HBeAg oluşmayabilir. Bu mutasyon, bir stop kodunu kodlayarak translasyonun sonlanması ve HBeAg yerine güdük bir protein oluşmasına neden olur. Böylece HBe Ag sentezi bloke edilir. Fakat replikasyon devam eder. Bu şekildeki mutant suşlar atlanabileceğinden replikasyonu gösterebilmek için HBeAg ve Anti-HBe'nin kullanılmasının güvenilir bir yol olmadığı bildirilmektedir (23,24).

HBeAg ve HBcAg oldukça immünojeniktir. Her ikisinin de T ve B hücrelerini tanıyan epitoplara sahip olduğu gösterilmiştir. Her ikisine karşı da hem hücresel hem de humoral cevap gelişir (3,18). HBcAg'nin immünojenitesi HBeAg'den daha fazladır ve daha çok T hücre bağımsız antijen özelliği gösterir. HBcAg'e özgül T hücreleri, HBsAg humoral cevabını başlatabilir ya da bu cevaba fonksiyonel yardım sağlayabilir (25). Ancak anti-HBs'nin tersine HBcAg'ne karşı oluşan antikorların koruyucu özelliği yoktur. Anti-HBc IgM, akut dönemde HBsAg'nin kaybolup anti-HBs'nin henüz belirmediği dönemde (pencere dönemi) pozitifleşir. Fakat tek başına akut enfeksiyon göstergesi değildir. Çünkü bazı HBV taşıyıcıları ile çoğu kronik hepatitli hastada düşük titrede de olsa bu antikorlara rastlanır. Bu nedenle anti-HBc IgM'nin pozitifliğinden çok negatif bulunması daha değerlidir (3).

**Pol (P) proteini;** bu protein en uzun gen bölgesi olan P geni tarafından kodlanır. Genomun  $\frac{3}{4}$ 'ünü kaplar. Pol proteini ürünleri virusun replikasyonunda önemli enzimatik görevler üstlenir. Nükleokapsid birleşmesi ve paketlenmenin koordinasyonunda rol oynamaktadır (26). Pol geni dört farklı bölgeden oluşmaktadır (27);

- a) Terminal protein (tp),
- b) Spacer (ara, birleştirici) bölge,
- c) Revers transkriptaz/ DNA polimeraz (rt),
- d) Ribonükleaz (rn) bölgesi.

**X proteini;** HBV genomunun en küçük geni olan X geni bölgesi tarafından kodlanır. Kanatlı hayvan hepadnaviruslarında yoktur. Fakat tüm memeli HBV'larında bulunur. Muhtemelen başlıca görevi viral proteinlerin üretimini arttırmaktır. Tümör süpresör gen ürününün (p53) işlevini bozarak, hepatosellüler karsinom gelişiminde rol oynayabileceği düşünülmektedir (28). Bu proteine karşı anti-HBx antikorları meydana gelir. Anti-HBx antikorlarının tespit edilmesinin hepatosellüler karsinomun erken tanısında yararlı olabileceği bildirilmiştir (29).

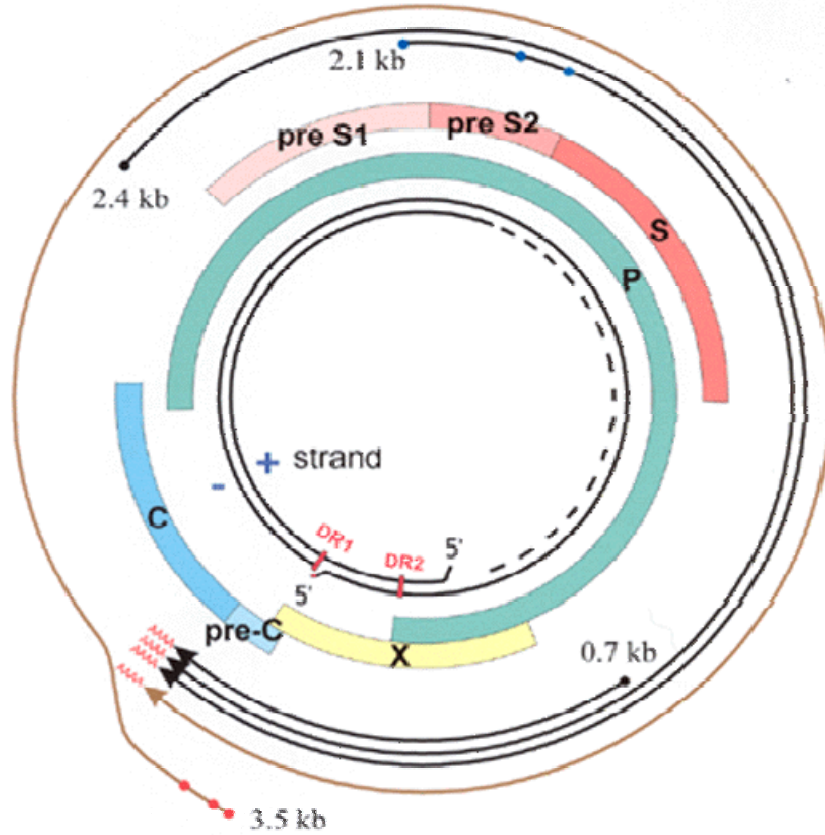
### 3.1.5. Viral Replikasyon

Hepatit B virusu için hedef organ karaciğer olup, hedef hücre ise hepatositlerdir. Hepatositler dışında monositlerde, pankreas hücrelerinde de HBV genomu saptanmıştır. Hepatit B virusunun insan hepatositlerine tutunma ve giriş için kullandığı yüzey molekülleri henüz kesin olarak aydınlatılamamıştır. Fibronektin, transferrin reseptörü, apolipoprotein H, polimeraz, insan serum albumini, pre-S2 glikan, HBV bağlayan faktör, endoneksin-2, siyaloglikoprotein gibi pek çok reseptör adayının HBV'nin konak hücreye bağlanmasında rol oynadığına inanılmaktadır.

Tüm yüzey antijenlerine sahip parçacıkların en yüksek aktiviteyi gösterdiği saptanmıştır. Dolayısıyla HBV'ye ait S, M ve L proteinlerinin bu reseptörlere tutunmada önemli rolleri olduğu kabul edilmektedir (16). Hepatosite bağlanan virusun konak hücre çekirdeğine nasıl ulaştığı da tam olarak bilinmemektedir. Muhtemelen HBV, reseptör bağımlı endositoz yoluyla hücre içine girmekte, virus zarfı ve hücre membranı arasında füzyon meydana gelmekte ve nükleokapsit sitoplazmaya sığınmaktadır. Kapsitin parçalanmasıyla da viral genomik DNA ve polimeraz çekirdeğe taşınmakta, daha sonra ise bu yapılar işlenmeden konak hücre çekirdeğine ulaşmaktadır (30). Viral replikasyonun başında polimeraz enzimi, nükleusa taşınan kısmen çift sarmallı ve her iki ucu serbest halde bulunan DNA (rcDNA; relaxed-circular, partially double-stranded DNA)'nın kısa sarmalının eksik olan bölümünün tamamlanmasında rol oynar. Bunun için negatif iplikçiğin 5' ucuna tutunmuş olan viral polimeraz, pozitif iplikçiğin 5' ucuna tutunmuş olan kısa RNA dizisinden başlayarak pozitif iplikçiği tamamlar. Uçlar arasındaki açıklık onarılır. Her iki DNA molekülü birbirine ligasyon reaksiyonu ile bağlanır. Sonuçta tamamiyle çift sarmallı, süper kıvrımlı, uçları kovalen bağla kapalı, sirküler yapıda HBV-DNA (covalently closed circular DNA= cccDNA) oluşur (31). Bu basamak viral genom replikasyonunun ilk ve en önemli aşamasıdır. cccDNA, viral pregenomik RNA (pgRNA) için kalıp görevi gördüğünden enfeksiyonun başladığını gösterir. Hepatit B virusu replikasyonu; pgRNA aracısını kullanarak revers transkripsiyonla rcDNA sentezlenmesi basamaklarını içeren bir süreçtir. cccDNA oluşumunun enfekte hepatositlerde virus inokulasyonundan sonraki ilk 24 saatte meydana geldiği saptanmıştır. cccDNA, HBV'nin hepatositlerde persistansında etkili olan molekül olup virusun antiviral tedavi sonrasında izlenen reaktivasyonlarından sorumludur (16). Çünkü RNA içeren viral kapsitlerin bazısı zarf antijenleri ile kaplanmayıp geri

hücre içine döner ve cccDNA'yı amplifiye ederek replikasyonunu devam ettirir (12). Konak hücre nükleusunda cccDNA kalıp olarak kullanılarak konak hücre RNA polimeraz yardımı ve viral düzenleyicilerin etkisi ile viral RNA'lar sentezlenir. Genomik DNA'dan transkripsiyon sonucu her biri farklı uzunlukta 4 adet mRNA sentezlenir ve transkriptler sitoplazmaya geçer (Şekil 2) (16). Bunlar:

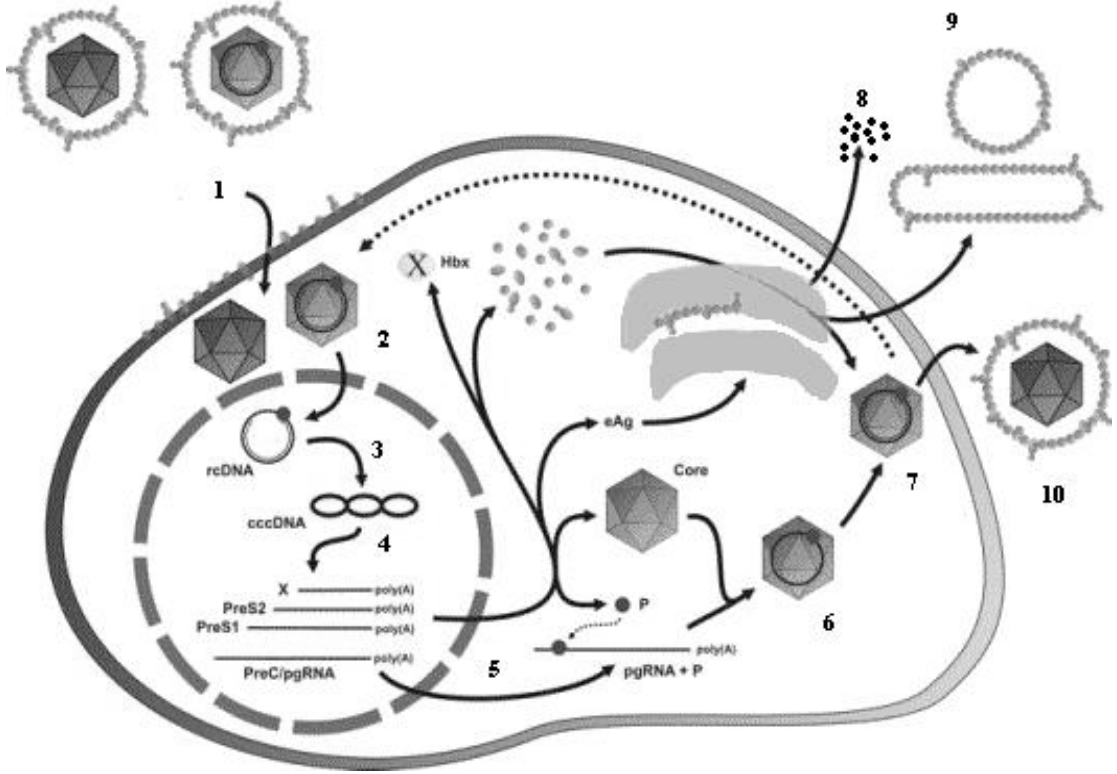
1. 3.5 kb'lık en büyük mRNA (pgRNA) : Genomik DNA'nın sentezinde kalıp görevi görür. Pre-C/C ile polimeraz proteinlerinin ekspresyonundan sorumludur.
2. 2.4 kb'lık mRNA: pre-S1, pre-S2 ve HBsAg'yi kodlar
3. 2.1 kb'lık RNA: sadece preS2 ve S proteinlerini kodlar.
4. 0.7'lık m-RNA: X proteinini kodlar.



Şekil 2. HBV genomik organizasyonu ve sentezlenen RNA'lar (16)



Oluşan bu transkriptler, sitoplazmada tranlasyon işlemi ile viral pregenom ürünlerini (HBsAg, HBcAg, HBeAg, polimeraz ve HBxAg) sentezlettirirler. Bu sırada 3.5 kb mRNA'ların bir kısmı selektif olarak P gen ürünleri ile birlikte, yeni sentezlenen kor partikülleri içine yerleşir. Kor partikülleri içinde viral polimeraz enziminin revers transkriptaz aktivitesi ile pgRNA'dan viral DNA (-) iplikçiği sentezlenir. Bu sentezlenme sırasında eş zamanlı olarak enzimin ribonükleaz H aktivitesi ile pgRNA yıkılır. Polimeraz aktivitesi ile (-) iplikçikten (+) iplikçik sentezlenerek viral genom oluşturulur. Kor kısmı kılıf proteinleri tarafından çevrilir. Polimeraz tükenir, bu nedenle kısa zincirin sentezi tamamlanamaz. Bu sarmal eksik kalır. Her 3 zarf proteinlerini içeren virionlar, endoplazmik retikulumdan golgi kompleksine taşınır. Burada zarf proteinlerinin glikolizasyonu tamamlanır ve olgun virion kan dolaşımına salınır (Şekil 3) (16,32,33).



1. Tutunma, adsopsiyon ve penetrasyon
2. Özyapının (core) çekirdeğe taşınması
3. cccDNA'nın oluşması
4. Transkripsiyon / viral RNA'ların sentezi
5. Translasyon / viral proteinlerin sentezi
6. Pre-genomik RNA ve viral polimerazın enkapsidasyonu
7. Revers transkripsiyon ile DNA sentezi
8. HBe antijeni salınımı
9. Sferik ve filamentöz partiküllerin salınımı
10. Olgun, infeksiyöz virionun (Dane partikülü) salınımı

**Şekil 3.** HBV replikasyonunun şematik görünümü (16)

### 3.1.6. HBV Genotipleri

Genotip; bir genomun genetik özelliklerini, nükleotid değişimlerini, nükleotid insersiyonu veya delesyonlarını temel alarak tip ya da subtip olarak tanımlanmasıdır. HBV genotipleri arasında tüm genom dizisinde %8; S genine göre ise % 4'den fazla farklılık bulunmaktadır. Buna göre HBV genomu A'dan H'ye 8 ana genotip oluşturmaktadır. Bu genotipler ile HBsAg subtipleri arasındaki ilişkilerin belirlenmesi amacıyla genom sekansları ile S geni sekansları karşılaştırılmış, S geni

düzeyinde genotip farklılık sınırı %4 olarak tespit edilmiş ve genotip-subtip dağılımı yapılmıştır (16).

Hepatit B virusu subtipleri, HBsAg pariküllerinde HBsAg proteinlerinin S bölgesini oluşturan aminoasitlerin belli bölgelerde farklı diziliş göstermeleri temel alınarak yapılan bir sınıflama sonucu belirlenir. Bugüne kadar ayw, ayr, adw, adr olarak adlandırılan 4 büyük subtipi ve e, j, k, q ve x veya gibi antijenik determinantlar ile awr, adwr, adyw, adyr ve adywr gibi alışılmadık subtip determinantları tanımlanmıştır. Bu subtipler, farklı genotipler içinde yer alır. Dünyada en yaygın coğrafik dağılımı genotip D gösterir. Ülkemizde yapılan genotip çalışmalarında da HBV genotip D'nin HBV enfeksiyonlarının tamamından sorumlu olduğu saptanmıştır (34). Yapılan subtip çalışmaları ile de ülkemizde HBV subtipi "ayw" olarak ortaya çıkmıştır (35). Grup spesifik determinant "a" tüm HBsAg subtiplerinde bulunur. Serumdaki antikor bağlayan aktivitenin %80'i bu bölgede olup virionun dış yüzünde bulunan "a" determinantına karşı gelişen antikorlar HBV'nin hepatositlere bağlanmasını engeller ve tüm subtiplere karşı etkili bir bağışıklık sağlar. "a" determinantı aşı veya doğal enfeksiyon sonrası oluşan antiHBs'lerin büyük kısmını bağlama özelliğine sahiptir (19). Farklı ya da benzer subtiplerle oluşan reenfeksiyonlardan korunmanın "a" determinantına karşı gelişen cevap ile olduğu düşünülmektedir (36). Hepatit B virusunun subtipleri monoklonal antikorlarla serolojik olarak ayırt edilebilir ve HBV enfeksiyonunun izini sürmede yardımcı olabilirler (37).

Genotiplerin viral replikasyon hızı, karaciğer hastalığının gidişi ve antiviral tedaviye cevaptaki rolleri yakın zamanda dikkat çekmiştir. Fakat yeterli bilgi birikimi henüz mevcut değildir. Elde edilen bilgiler, bazı genotiplerin HBe serokonversiyonu ve spontan remisyon, karaciğer hastalığı şiddeti ve tedaviye cevapla ilgili

olabileceğini düşündürmektedir (38). HBsAg-negatif HBV enfeksiyonlarının %61'inde genotip D görülürken HBsAg pozitif hastaların %53'ünde genotip A enfeksiyonu tespit edilmiştir (4). Bu da ülkemizde olduğu gibi genotip D'nin yaygın olarak bulunduğu bölgelerde HBsAg negatif kanlar ile HBV geçişinin daha sık olabileceğini düşündürmektedir.

### **3.1.7. HBV Mutasyonları**

Hepatit B virusu enfeksiyonu, HIV ve HCV enfeksiyonu gibi yüksek düzeyde virion üretimi ve yıkımı ile karakterize bir enfeksiyondur. Viral genomun kodladığı bir revers transkriptaz enzimi ile viral genomdan daha uzun bir RNA ara ürün (pregenomik RNA) üzerinden virus replikasyonu gerçekleşir. Viral genomda kodlama yapmayan hiçbir bölge yoktur. Genomun sirküler yapısı nedeniyle proteinleri kodlayan gen dizileri üst üste çakıştığı için (overlapping) herhangi bir proteini kodlayan bölgede ortaya çıkan dizi değişikliği (mutasyon, delesyon vs.) diğer proteinin sentez ve yapısını etkileyebilir. Örneğin, P ORF'deki mutasyonlar daha çok ilaçlara direncin ortaya çıkışını sağlarken; S ORF ürünlerinin antijenik yapısını da etkilemektedir. HBV ile enfekte olgulardan elde edilen suşlar üzerinde yapılan çalışmalar ile genom üzerinde herhangi bir yerde (S, pre-C/C, X, P, Promoter ve Enhancer) ortaya çıkabilen bu mutasyonların şu mekanizmalarla oluştuğunu göstermiştir (19,26).

- 1- Genom üzerinde herhangi bir yerde, bir veya daha fazla nükleotidin silinmesi,
- 2- Tek bir taban bazının değişimi (nokta mutasyon),
- 3- Aynı sekansın düz veya ters biçimde tekrar edilmesi,
- 4- Nükleotid sekanslarının yeniden düzenlenmesi.

Aktif bağışık cevaba rağmen bu mutant suşların oluşumu ile virus yaşama devam eder. Bu da tanıda karışıklığa ve aşı çalışmalarında başarısızlıklara yol açar. Bu mutasyonlar:

a) Yüzey Kılıf Mutasyonları; HBV genomunun en heterojen bölgesi pre-S dizilimidir (39). HBV'nin S gen bölgesinde mutasyonların görülmesi mümkündür. Eğer bu mutasyon pre S/S bölgesindeki bir noktadaysa, HBsAg antijenitesinde ve anti-HBs cevabında değişikliğe neden olabilmektedir (4,40). Tüm tiplerde "a" determinantı ortaktır. Bu bölgeye karşı oluşan antikolar HBV'nin hepatositlere bağlanmasını önler. Aşılama veya doğal enfeksiyon sonrası herhangi bir subtipte karşı gelişen humoral bağışıklık tüm serotiplere karşı koruma sağlar. Günümüzde uygulanan hepatit B aşılarının çoğu HBsAg'ni taşımaktadır. Fakat "a" determinantında olan aminoasit değişiklikleri HBsAg'nin üç boyutlu yapısında önemli değişikliğe yol açmakta; anti-HBs'nin nötralizan etkisinden kurtulmasına ve replikasyona devam etmesine neden olmaktadır. Bu şekildeki mutasyonlar sonucu oluşan kaçak (escape) mutant viruslar HBV aşılması ile korunulamayan enfeksiyonlara neden olur (41). Ayrıca rutin kan donörü taramalarında kullanılan HBV'nin "a" determinantına duyarlı olan ticari ELISA kitlerinin HBsAg'i saptayamamasına neden olur. Bu durum, gizli HBV enfeksiyonlu hastaların bazılarının patogeneğinde görev alırken (4), anti-HBs bulunmasına rağmen HBV enfeksiyonu gelişmesine de neden olabilmektedir (42).

b) Prekor/kor mutasyonları: Prekor bölgesinde görülen en önemli mutasyon HBeAg'nin üretilmemesi ile sonuçlanan "stop kodon" oluşumudur. Normalde prekor bölgesinde stop kodon bulunmaz. Prekor bölgesinin başlangıç kodonundan başlayan sentez işlemi kor bölgesinin start kodonu ile devam eder. Prekor bölgesinde meydana gelen stop kodon mutasyonunda translasyon sonlanır. HBeAg yerine güdük

bir protein oluşur. Böylece “e” antijeni sentezi bloke edilir ve HBeAg üretilmez. Fakat HBcAg'nin sentezi devam eder (43). HBeAg sentezleyemeyen mutant suş, muhtemelen konağın sitotoksik cevabından kaçarak hayatını sürdürmektedir. Üzerinde HBeAg bulunan hepatosit, anti-HBe'nin de etkinliği ile bir süre sonra lizise uğrar. Sonuçta, HBeAg negatif mutant suş dominant hale gelir. Prekor mutantların varlığı; asemptomatik HBV taşıyıcılarında, kronik viral hepatit B'li olgularda, ciddi karaciğer hastalığı olanlarda ve fulminan hepatit B'li hastalarda gösterilmiştir. Bu mutantların hepatositlere nasıl zarar verdiği henüz tam olarak bilinmemektedir. HBeAg negatif mutantlar ile enfekte olgularda farklı serolojik profillere rastlanır. Normalde HBeAg'nin kaybolması, HBV-DNA'nın azalmasıyla birlikte olur. HBV-DNA, bazı olgularda immunoblot tekniği ile her zaman gösterilemeyebilir. Şüpheli durumlarda PZR ile araştırılmalıdır. HBV-DNA testlerinin kullanıma girmesi ve HBeAg-negatif mutantların tespitinden sonra, HBeAg ve anti-HBe'nin viremiyi gösteren güvenilir parametreler olmadığı ortaya çıkmıştır. Viral replikasyonun direkt göstergesi HBV-DNA'nın tespitidir. Kor bölge mutasyonu sonucu HBV, özellikle T hücre cevabından kaçmayı başarmaktadır (44,45).

c) Polimeraz geni mutasyonları: Polimeraz gende doğal olarak ortaya çıkan mutasyonlardan ziyade, nükleozid analogları ile tedavi sırasında ortaya çıkan ve ilaç direncine neden olan mutasyonlar önem taşır. Nükleozid analogları arasında en çok denenilen ajan lamivudin olup, bir revers transkriptaz inhibitörüdür. Hepatit B virusu replikasyonunu etkili bir şekilde baskılar ve HBV-DNA seviyelerini düşürür. Tedavi sırasında ortaya çıkan mutasyonlar 6 aydan sonra görülmeye başlar ve sıklığı zamanla artar. Bu mutasyonlardan en sık YMDD mutasyonu görülmektedir (46). Lamivudine dirençli HBV mutantları HIV suşları ile aynı mutasyona sahiptirler (47).

d) X geni mutasyonları: HBxAg regülatör bir proteindir. Bu gendeki

mutasyonların önemi bilinmemektedir. Kronik HBV enfeksiyonlu, HSK'lı, fulminan hepatit B'li ve ilerlemiş sirozlu hastalarda X geni üzerinde mutasyonlar tespit edilmiştir. Bu gruplarda DNA ekspresyon ve replikasyonun baskılandığı ve bu şekilde HBsAg'nin negatifleştiği bildirilmiştir (58).

## **3.2. HEPATİT B VİRUSUNUN EPİDEMİYOLOJİSİ**

### **3.2.1. Hepatit B Virusunun Bulaş Yolları**

HBsAg ve HBV-DNA serum, idrar, ter, gözyaşı, semen, tükürük, feçes, beyin omurilik sıvısı, vaginal salgılar gibi birçok vücut salgısında saptanmıştır. Salgılardaki viral yük yoğunluğu değişkendir. En fazla serumda, sonra semen ve tükürükte bulunmaktadır. Bu nedenle semen ve tükürüğün bulaşta önemli bir aracı oldukları kabul edilirken diğer salgıların bu açıdan çok önemli olmadıkları düşünülmektedir (49).

HBV enfeksiyonunun dört ana bulaş yolu vardır;

1. Perkütan bulaş: Enfekte kan ve vücut sıvıları ile mukozal ya da kutanöz temas sonucu oluşan bulaşma şekli olup en önemli bulaşma yollarından biridir. Çoğul transfüzyon yapılan hastalar, hemodiyaliz hastaları, damar içi uyuşturucu bağımlıları, dövme yaptıranlar, özellikle cerrahlar, patologlar, hemodiyaliz çalışanları olmak üzere sağlık çalışanları perkütan bulaşma için yüksek risk taşıyan gruplardır. Virus insan vücudu dışında yedi günden uzun süre canlı kalabilir. Bu nedenle, kanla bulaşmış diş fırçası, havlu, jilet, traş makinesi, banyo malzemeleri gibi günlük eşyaların ortak kullanımı da bulaş kaynağı olabilmektedir (49).

2. Cinsel temas: En çok risk taşıyanlar homoseksüellerdir. Genital sekresyonlarda düşük miktarda virus bulunmasına rağmen heteroseksüel temas ile de bulaş mümkündür. Semen ve tükürükteki viral yük aynı kişinin serumundakinden  $10^3$  kez

daha azdır. Ancak semen ve tükürüğün bulaşta önemli bir aracı oldukları kabul edilir. Çünkü semen ve tükürükte sürekli enfeksiyöz virion bulunur. Eşleri HBV ile kronik enfekte olanlar, cinsel yolla bulaşan başka bir hastalığı olanlar, çok eşliler de risk altındadır (49).

3. Perinatal-vertikal bulaşma: Enfekte anneden yenidoğana bulaşma şeklidir.

Bulaşma; gebelik sırasında, doğum esnasında veya doğum sonrası olabilir. Taşıyıcı bir annenin perinatal dönemde (3.trimester-doğum sonrası ilk 2 ay) enfeksiyonu bebeğine geçirme ihtimali yüksek (%40-50), intrauterin bulaşma oranı ise daha düşüktür (%5-10). Eğer annede HBeAg pozitifliği söz konusu ise bu oran %70-90'a ulaşır. Bunlarda enfeksiyon %90 kronikleşir (50).

4. Horizontal bulaşma: Enfekte kişilerle cinsellik içermeyen yakın temas sonucu oluşabilen bulaşma şeklidir. Mekanizması tam olarak bilinmemektedir. Düşük sosyoekonomik düzey, kötü hijyen, kalabalık yaşam şartları HBV bulaşını artırmaktadır (11). HBV'nin hepatositler yanında periferik kanda mononükleer hücrelerde de replike olabilmesi nedeniyle az miktardaki enfekte kanın, cinsellik içermeyen yakın temastaki bireylerin hasarlı derisiyle temasının horizontal bulaşmaya yol açabileceği düşünülmektedir. Tükürük gibi vücut sıvıları da hasarlı deriye temas ederse bulaşma olabilir (50).

Enfeksiyon genellikle yetişkin çağda kazanılmaktadır. Erişkinler için enfeksiyonla karşılaşma oranı %20'yi geçmez. Cinsel temas ve perkütanöz temas en önemli bulaş yolu olmakla birlikte perinatal ya da erken çocukluk döneminde alınan enfeksiyon da HBV enfeksiyonuna önemli ölçüde kaynaklık etmektedir. Çünkü; enfeksiyonu taşıyan infant oyun arkadaşına, ileride cinsel partnerine ve eğer kadınsa doğuracağı çocuğuna enfeksiyonu geçirebilir (51).



### **3.2.2. Hepatit B Virus Enfeksiyonunun Prevalansı**

Dünyada HBV ile karşılaşmış insan sayısı iki milyarın, HBV taşıyıcı sayısı ise 400 milyonun üzerindedir. Her yıl yaklaşık olarak 500000–1200000 kişi HBV ile ilişkili nedenlerle ölmektedir. Hepatit B virusuna bağlı hastalıklar Asya, Afrika ve Pasifik kıyılarında en önemli üç ölüm nedeninden biridir (52).

Hepatit B virusu enfeksiyonu, tüm dünyada coğrafik bölgelere göre farklı dağılımlar göstermektedir. Hepatit B virusunun görülme sıklığına göre düşük, orta, yüksek endemisite bölgeleri tarif edilmiştir (11). HBsAg pozitifliği % 8'in üzerinde olan ülkeler yüksek endemisite (Uzak doğu ülkeleri, Afrika ülkeleri, Amazon bölgesi, Pasifik adaları, Alaska, Avustralya ve Yeni Zelanda yerlileri), % 2-7 arasında olanlar orta endemisite (Kuzey Afrika ülkeleri, Ortadoğu ülkeleri, Akdeniz havzası, doğu Avrupa ve Rusya), % 2'nin altında olanlar ise düşük endemisite (ABD, kuzey ve batı Avrupa ülkeleri, Avustralya) bölgeleri olarak tarif edilmiştir. Viral hepatitle ilgili ülkemizde yapılan çalışmalar sonucu elde edilen veriler, Türkiye'nin hepatit B açısından orta derecede endemik bir bölgede olduğunu göstermektedir (11,20). Dünya genelinde HBsAg pozitifliği % 0.1-20 arasındadır (49). Türkiye'de ise toplumun genelinde yapılan taramalarda % 1.7-21 arasında dağılım bildirilmiştir. HBsAg pozitifliği en yüksek oranda sırasıyla Eskişehir, Antalya, Diyarbakır, Adana, Elazığ, Erzurum ve Sivas'ta bulunmuştur (53,54). Anti-HBs prevalansı ise % 20-56 arasında verilmektedir (49).

### **3.3. HEPATİT B VİRUS ENFEKSİYONU**

Hepatit B virus enfeksiyonunun kliniği değişkendir; akut düzelen hepatitten karaciğer yetmezliği ve ensefalopatinin eşlik ettiği fulminant hepatite, inaktif taşıyıcılıktan karaciğer sirozuna kadar farklı tablolar şeklinde görülebilir. Akut viral

hepatitte enfeksiyonun seyri; inkubasyon dönemi, preikterik dönem, ikterik dönem ve konvelesan dönem olmak üzere başlıca dört kategoride incelenebilir (55). Akut HBV enfeksiyonunun inkubasyon dönemi 60-180 gün arasındadır; % 75 subklinik, % 25 aşikar seyredir. Akut HBV enfeksiyonunun kliniği ve seyri, enfeksiyonun alındığı yaşa, virusun genetik yapısına, eşlik eden başka hepatotrop virus enfeksiyonunun varlığı ve konakçının immün durumuna göre değişiklik gösterir. Çocuklarda ve gençlerde daha hafif seyredir. Dört yaşın altındaki çocuklarda % 90, 30 yaşın üzerindeki yetişkinlerde ise % 70 oranında asemptomatik geçirildiği bildirilmiştir (56). Akut HBV enfeksiyonu hikâyesi olmayan kişilerde yüksek oranda taşıyıcılık bulunması hastalığın daha çok subklinik geçirildiğinin bir göstergesidir. Asemptomatik olan bu olgularda kronikleşme eğilimi daha fazladır (55). Sağlıklı yetişkinlerde akut enfeksiyondan sonra kronikleşme oranı % 5 düzeylerinde iken, enfeksiyonu asemptomatik geçiren yenidoğanlarda bu oran % 90, beş yaşa kadar olan çocuklarda ise % 25-30 civarındadır (57). Hastaların % 0.1-0.5'inin fulminan seyredebildiği, özellikle "Precore" ve "core promoter" mutasyonlarına sahip viruslarla olan enfeksiyonda fulminan seyir görülebildiği rapor edilmiştir (48). Eşlik eden HDV veya HCV enfeksiyonu varlığında akut HBV enfeksiyonlarının daha fazla semptomatik olabildiği, kronik böbrek yetmezliği, immün supresif kullanma, kanser kemoterapisi alma gibi immün sistem yetersizliği durumlarında daha yüksek oranda kronikleşebildiği bildirilmektedir (58).

Primer enfeksiyonda HBsAg inkubasyon periyodu sonrası kanda belirmeye başlar ve bunu kısa bir süre sonra anti-HBc'nin kanda görülmesi izler. HBsAg, akut viral hepatit B olgularında 2-6 ay içinde kaybolur. HBsAg'nin serumda altı aydan uzun süre tespit edilmesi taşıyıcılığı gösterir (59). Serum transaminaz değerleri normal olan, karaciğer hastalığının diğer belirtileri de olmayan, HBsAg pozitif kişiler

için “sağlıklı taşıyıcı” terimi kullanılmaktadır. National Institutes of Health (NIH)’in 2000 yılında yaptığı uzlaşma toplantısında HBV enfeksiyonu için kullanılan klinik terimler yeniden gözden geçirilmiş ve “asemptomatik HBsAg taşıyıcılığı” veya “sağlıklı HBsAg taşıyıcılığı” terminolojisi yerine “inaktif HBsAg taşıyıcılığı” ifadesinin kullanılmasına karar verilmiştir (60). Taşıyıcılarda genellikle anti-HBc pozitifdir. Taşıyıcıların %70’i kronik persistan hepatit (KPH) olarak kalırken, %30’unda kronik aktif hepatit (KAH) gelişir. Kronik persistan hepatit olarak tanımlanan hastalar genellikle sağlıklıdırlar ve sarılık olmaksızın kalıcı veya tekrarlayan AST ve ALT yükselmeleri gösterirler. Kronik aktif hepatitte ise prognoz değişkenlik gösterir ve birçok hastada (%15-20) beş yıl içerisinde siroza ilerleme, sirozlu hastaların %20’sinde ise HSK saptanır (61). Hepatit B virusu taşıyıcılarında hepatosellüler karsinom gelişme riskinin enfekte olmayan kişilere göre 100 kat daha fazla olduğu bildirilmektedir (62).

Hepatit B virus enfeksiyonlu hastalarda HBeAg’nin pozitif, anti-HBe’nin negatif olması viral replikasyonun olduğunu; HBeAg negatif, anti-HBe’nin pozitif olması replikasyonun sona erdiğini gösterir. Fakat bazen anti-HBe pozitifken HBV-DNA’nın da pozitif olması, mutant bir enfeksiyonun varlığını gösterir. Bu nedenle serumda viral DNA’nın saptanması, enfeksiyöz virion varlığının en kuvvetli kanıtı olmaktadır (44,45).

### **3.3.1. Hepatit B Virus enfeksiyonunun Tanısı**

**1-Serolojik Tanı:** Hepatit B virusu ile enfeksiyon oluştuğunda organizmada virusa ait çeşitli antijenlere (HBsAg, HBcAg ve HBeAg) karşı antikorlar meydana gelmektedir. Hepatit B virusu enfeksiyonlarının özgül tanısını yapmak amacıyla hasta serumunda bu antijenlerin ve antikorların varlığı araştırılmaktadır. Bunların

saptanması için günümüzde duyarlılığı, özgüllüğü ve verimliliği yüksek serolojik yöntemlerden yararlanılmaktadır. Virusa ait antijenler (HBsAg ve HBeAg) ile, antijenlere karşı gelişen antikorlar (anti-HBc IgM, total anti-HBc veya anti-HBc IgG, total anti-HBs ve anti-HBe IgG) ticari olarak bulunan birçok RIA (Radioimmunoassay) ve ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assays) kiti aracılığıyla saptanabilir. Viral HBcAg dolaşıma katılmadığı ve sadece hepatositler içinde bulunduğu için serolojik olarak saptanamamaktadır. Bu testler; akut ve kronik enfeksiyon ayrımının yapılmasında, infektivitenin değerlendirilmesinde, bağışıklık durumunun tayininde, kan ve organ vericilerinin taranmasında rutin olarak kullanılmaktadır (11). Enfeksiyonun tanısında ve izlenmesinde kullanılan serolojik göstergeler Tablo 1’de gösterilmiştir (63).

**Tablo 1.** Enfeksiyonun tanısında ve izlenmesinde kullanılan serolojik göstergeler

<b>Gösterge</b>	<b>İnkubasyon periyodu</b>	<b>Akut enfeksiyon</b>	<b>Eski enfeksiyon</b>	<b>Kronik enfeksiyon</b>	<b>Aşılama</b>
HBsAg	±	+	-	+	-
Anti-HBs	-	-	+	-	+
Anti-HBc total	-	±	+	+	-
Anti-HBcIgM	-	+	-	±	-
HBeAg	+	+	-	±	-
Anti-HBe	-	-	±	±	-
HBV DNA	±	+	±	+	-

Hastanın serolojik test sonuçlarına göre yorum yapmak bazen çok kolay olabilmekte, ancak zaman zaman beklenmeyen sonuçlarla karşılaşılabilir. Bu nedenle yorumlamayı çok dikkatli yapmak gerekmektedir. Duruma göre testler

tekrarlanmalı ve gerek duyulduğunda moleküler tanı yöntemlerinden de yararlanılmalıdır (63).

## **2- Direkt Tanı Yöntemleri:**

**a) Hücre Kültürü:** Hepatit B virusu, erişkin ve fetal hepatosit kültürlerinde üretilmektedir. Rutin kullanım için uygun bir yöntem değildir, daha çok viral patogenezin araştırılması amacıyla kullanılmaktadır.

**b) Viral Antijenlerin Gösterilmesi:** Doku örneklerinde immünoperoksidaz ve immünofloresan boyalarla HBV antijenleri gösterilebilir. Hepatosit içinde HBsAg sitoplazmada, HBcAg ise genellikle çekirdekte saptanır. Rutinde kullanımı zor olan, daha çok araştırma amacıyla kullanılan yöntemlerdir (11).

**c) Viral Nükleik Asitlerin Gösterilmesi (Moleküler Tanı Yöntemleri):** Hepatit B virusu DNA'sının kanda saptanması, aktif HBV replikasyonunun güvenilir bir göstergesi olup, enfeksiyonun tanısında, evrelendirilmesinde, tedaviye karar vermede ve tedavi başarısının izlenmesinde önemli rol oynamaktadır. Hepatit B virusu DNA'sının saptanması ve kantitasyonu amacıyla farklı yöntemler geliştirilmiştir. Testler iki grupta toplanır;

1. Hibridizasyon temelli testler (sinyal amplifikasyonu): Viral DNA, işaretli prob yardımıyla saptanır. Probdan elde edilen sinyal çoğaltılarak ölçülür. Dinamik aralıkları geniş, duyarlılıkları  $10^{4-5}$  kopya/ml civarındadır. Dinamik aralığı koruyarak daha duyarlı testlerin geliştirilmesi çalışmaları sürmektedir (64).

2. Nükleik asid amplifikasyon temelli testler: Viral DNA'nın çoğaltılarak saptanması esasına dayanır. Nükleik asidin çoğaltılması amacıyla polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) veya transkripsiyon üzerinden amplifikasyon (TMA) gibi yöntemler kullanılabilir. Test seçiminde belirleyici olan, gereksinim duyulan duyarlılık sınırı ve kantitasyon aralığıdır. Hibridizasyon esaslı testlerin

duyarlılıklarının düşük olması, yüksek duyarlılık istenen durumlarda (HBsAg negatif HBV enfeksiyonunun tanısı, tedavi izlemi, vb.) kullanımlarını kısıtlamaktadır. Serumdaki 10 kopya/ml miktarındaki HBV DNA'yı saptayabilen PZR gibi testler; aşırı duyarlı olması nedeniyle düşük düzey HBV enfeksiyonunun tanısında ve erken tanıda yararlı olmaktadır (64). Bu yöntemlerle önceleri örnekte viral genomun varlığı kalitatif yönden araştırılmakta iken, geliştirilen tekniklerle kantitatif olarak genomun örnekteki miktarı da saptanmaya başlanmıştır. Moleküler tanı konusundaki en önemli gelişme HBV DNA testlerinin duyarlılığını artıran gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (Real time PCR tekniğinin ortaya çıkması ve gelişmesidir. Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu, ışığa özelliğine sahip moleküller kullanarak, PZR oluşurken izleme ve miktar belirleme (kantitasyon) yöntemidir (65). Bu yöntem ile sonuçlar kantitatif olarak daha kısa zamanda verilmekte ve farklı HBV genotiplerini saptamak mümkün olmaktadır. Ancak çeşitli kantitatif test sonuçları arasında standardizasyon sorunu bulunmakta ve bu sorunlar çözümlenmeye çalışılmaktadır (20).

### **3.4. GİZLİ HEPATİT B VİRUS ENFEKSİYONU**

Hepatit B virusu enfeksiyonunun iyileşmesi, HBsAg'nin kaybolması ile birlikte HBV-DNA'nın negatifleşmesi ve anti-HBs pozitifliği olarak tanımlanır. Spontan veya tedavi ile HBsAg kaybolan bazı hastalarda serum ve/veya karaciğerde hassas PZR teknikleri ile düşük düzeyde HBV-DNA ( $10^3$  viral genom altında) varlığı gösterilmiştir (5,6,66). Günümüzde, HBV enfeksiyonunun tanı ve prognozunun değerlendirilmesinde, viral antijenlerin ve bunlara karşı oluşan antikorların saptanması ile yapılan serolojik yöntemlerin yetersiz kaldığı düşünülmektedir (67). Bu şekilde belirlenemeyen HBsAg ile birlikte kronik HBV enfeksiyonunu

tanımlayan bu yeni durum, “gizli” (okült) “sessiz” veya “latent” HBV enfeksiyonu olarak adlandırılmaktadır. Diğer bir ifade ile, HBsAg’nin çeşitli sebeplerle saptanamadığı (anti-HBc ve anti-HBs’nin HBsAg negatifliğine eşlik ettiği ya da etmediği) HBV enfeksiyonu olarak da tanımlanabilir (66). Bu hastalarda serum HBV-DNA seviyesi genellikle  $10^4$  kopya/ml’den düşüktür ( $10^{2-3}$  kopya/ml serumda, 0,01-0,1 kopya/ karaciğer hücresinde) (4,68).

Gizli HBV iyi tanımlanmış bir klinik durumdur ancak oluşum mekanizması henüz tam olarak açıklanamamıştır. Bununla ilgili öne sürülen birkaç hipotez vardır. Bunlar:

1-HBV’nin S bölgesinde mutasyon: Pre-S/S bölgelerindeki herhangi bir mutasyon HBs antijenitesini veya üretimini etkileyebilir. Anti-HBs üretiminde inhibisyona neden olabilir. Bazı gizli HBV enfeksiyonlu hastalarda belli pre-S/S mutasyonları gösterilmiştir. Bazı donörlerde de “a” determinantında mutasyonlar görülmüştür. Bu da HBsAg’nin saptanamamasına neden olmuştur. Bu serumlarda HBsAg negatif, anti-HBc pozitifken, yüksek düzeyde HBV’ne rastlanabilmektedir (69).

2-HBV-DNA’nın konak kromozomlarına entegrasyonu: Gizli HBV enfeksiyonlu hastalarda genoma entegre veya serbest epizomal HBV-DNA molekülleri gösterilmiştir (70). Bu durum virus DNA zincirinin yeniden düzenlenmesine neden olabilir. Sonuçta HBsAg ekspresyonu azalabilir veya durabilir. Gizli HBV enfeksiyonlu HSK hastalarında HBV entegrasyon sıklığı fazla bulunmuştur. Son çalışmalarla bu hastalarda PZR amplifikasyon yöntemi kullanılarak HBV-DNA entegrasyonunun belirgin olarak yüksek bulunduğu (>% 50) tespit edilmiştir (71).

3-Periferik kan mononükleer hücrelerinde (PKMH) HBV enfeksiyonu: Akut, gizli ve kronik HBV enfeksiyonu sırasında PKMH'de HBV-DNA'nın sık bulunduğu gösterilmiştir (72). Daha ileri çalışmalar PKMH'in farklı subgruplarında da (monosit, T ve B hücre subtipleri) HBV saptandığını göstermiştir (4).

4-HBV içeren immün kompleks oluşumu: Akut kendini sınırlayan Hepatit B'nin iyileştiği ve anti-HBs'nin oluştuğu tespit edilen olgularla yapılan birkaç çalışmada, hepatit B iyileştikten sonra da kanda HBV partiküllerinin bulunduğu gösterilmiştir (73). Akut HBV enfeksiyonunun erken fazında, HBV hem serbest halde hem de immünglobulinlere (Ig) bağlı bulunur. Daha sonra HBsAg'nin anti-HBs'e serokonversiyonu sonucu daha çok immünglobulinlere bağlı bulunur. İmmün kompleksler tarafından maskelenmesi, HBsAg'nin saptanamamasına neden olabilmektedir (4). İzole anti-HBc pozitif kişilerin %30'undan fazlasında kompleks oluşturmuş HBsAg tespit edilmiş ve bunların %39'unda HBV-DNA saptanmıştır (74).

5-Konak immün cevabı; Hepatit B virusu enfeksiyonunun seyri, konağın immün cevabı ile viral replikasyon düzeyinin dengesine bağlıdır. Virus eliminasyonunda hem hücresel hem de humoral faktörler rol oynar. Multispesifik yeterli bir T hücre cevabı, virusu temizler. Fakat yetersiz cevap, virusun kalıcı olmasına yol açar. Teorik olarak konak immün cevabın azalması, latent HBV enfeksiyonu gelişmesine neden olabilmektedir (4). Karaciğer nakli sonrasında immün süpresyon ile HBV enfeksiyonu nüksetmesi, buna bir örnektir. Kronik C hepatitli hemodiyaliz hastalarında da gizli HBV enfeksiyon oranı (%36,4) yüksek bulunmuştur (75).

6-Ko-enfeksiyon; Kronik C hepatitli hastalarda gizli HBV enfeksiyonu sıktır. Çalışmalar HCV "core" proteininin HBV replikasyonunu engellediğini göstermiştir



(76). Hepatit B virusu, HCV birlikteliğinin, anti-HBs üretimini azalttığını, HBsAg klirensini de arttırdığını göstermektedir. İzole anti-HBc pozitif olgularda, anti-HBc ve anti- HBs'nin birlikte bulunduğu olgulara göre daha sık HCV ile koenfeksiyon bulunduğu gösterilmiştir (77). Hoofnagle ve ark. izole anti-HBc pozitifliği olan HIV hastalarının %90'ında HBV-DNA bulunduğunu göstermişlerdir (78).

Gizli HBV'nin bazı hasta gruplarında daha sık gözlemlendiği bildirilmiştir (6):

- Hepatosellüler karsinomlu kronik HCV enfeksiyonu,
- Anti-HBc pozitif vericilerden karaciğer alanlar,
- Anti-HBc pozitif kronik Hepatit C'liler,
- Kriptojenik siroz/fibrozis,
- Hemodiyaliz hastaları,
- İntravenöz uyuşturucu kullananlar.

Gizli HBV enfeksiyonu ile HBV enfeksiyonunun iyileşmesi arasındaki sınır net değildir. İyileşme her hastada HBV'nin tamamıyla yok edildiği anlamına gelmez, ancak güçlü bir immün cevap ile baskılanmıştır. Araya giren immünsüpresyon yeniden aktivasyona yol açabilir (79).

Gizli HBV enfeksiyonunun önemi tartışmalıdır. Hepatit B virusu genomu varlığının, karaciğer hastalığına sebep olup olmadığı veya geçirilmiş bir enfeksiyon göstergesi olup olmadığı araştırılmaktadır. Hoofnagle ve ark. 1978'de HBsAg ve anti-HBs negatif, anti-HBc IgG pozitif kan transfüzyonu sonrasında HBV enfeksiyonu geliştiğini bildirmişlerdir (78). Polimeraz zincir reaksiyonu yöntemi ile HBsAg negatif, anti-HBs pozitif hastalarda serumda HBV-DNA varlığı gösterilmiştir (80). Bu tespitle, rutin serolojik profillerin HBV enfeksiyonunun durumunu belirlemede her zaman güvenilir olmadığı düşünölmeye başlanmıştır. Rutin

hibridizasyon yöntemleri ile  $10^4$  kopya/ml'nin altındaki HBV DNA miktarı saptanamaz. Bu nedenle gizli HBV enfeksiyonu tanısı için hibridizasyon yöntemlerinden daha duyarlı olan PZR yöntemleri kullanılmaktadır (68).

### **3.4.1. Gizli Hepatit B Virus Enfeksiyonunda Seroloji ve Moleküler İnceleme**

Hepatit B virusu enfeksiyonunda; sırasıyla HBsAg oluşumu, HBsAg klirensi, anti-HBs oluşumu ve anti-HBc gelişmesi izler. Anti-HBs kaybolursa, HBV enfeksiyonuna ait tek belirteç olarak serumda anti-HBc kalır. Gizli HBV enfeksiyonu, tek başına anti-HBc'si pozitif olanlarda daha sık görülür. Bununla birlikte yalnız anti-HBs'si pozitif olan veya hiçbir serolojik HBV markırı taşımayan hastalarda da gizli HBV enfeksiyonu bildirilmiştir (80,81). Akut HBV enfeksiyonu iyileştikten sonra da gizli HBV enfeksiyonu gelişebilir (73). Siroz veya kronik hepatitli hastalarda spontan ya da antiviral tedavi sonucu HBsAg'nin seroklirensi sonrasında da oluşabilir. Yapılan çalışmalarda seri HBV-DNA testlerinin yapılması ile HBV enfeksiyonunun kademeli olarak azaldığı, bu nedenle gizli HBV enfeksiyonu prevalansının HBsAg konversiyonundan sonra zamana bağımlı olduğu gösterilmiştir (82).

Gizli HBV enfeksiyonu olan hastaların serumunda DNA düzeyi genellikle  $10^4$  kopya/ml'den daha düşüktür (68). Bu değer, HBsAg pozitif HBV enfeksiyonlu hastalardaki değerden oldukça düşük olup, rutin hibridizasyon yöntemi ile belirlenemez (45). Nested PZR, gizli HBV saptanmasında kullanılan duyarlı bir methodur. Bununla birlikte, intermitan pozitiflikler sebebiyle gizli HBV enfeksiyonu gözden kaçabilir (1). Rutinde kullanılan standardize bir PZR metodu yoktur, ancak

analizde kullanılan testlerin duyarlılıkları 1-3 viral partikül /ml ile 600 kopya/ml arasında değişmektedir. Serum örneğinden DNA'nın ayrıştırılması, kullanılacak testin duyarlılığı, kullanılan total DNA miktarı ve PZR primerleri sonuçların güvenilirliği açısından çok önemlidir. PZR testlerinin çoğunda primer X veya S genine aittir. Serumla çalışıldığında S genini çoğaltanlar, karaciğer için ise X genini çoğaltanların daha duyarlı olduğu bildirilmiştir (83).

## 4. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmada Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesine başvurmuş ve tedavileri yapılmakta olan hemodiyaliz, periton diyalizi ve prediyaliz hastalarında gizli HBV enfeksiyonunun araştırılması planlandı. Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulunca onaylanan bu çalışma (FÜBAP 2006/2-9, Tıpta Uzmanlık, Proje no:1289), Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı ile Nefroloji Bilim Dalı'nın ortak katkılarıyla gerçekleştirildi. Hemodiyaliz, periton diyalizi ve prediyaliz hastalarının serumlarında PZR yöntemi ile HBV DNA varlığı araştırıldı.

### 4.1. Hastaların Seçimi

Kronik böbrek yetersizliği nedeniyle Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Diyaliz Ünitesinde hemodiyaliz tedavisi alan 81 hasta, daha önce kronik hemodiyaliz tedavisi uygulanmadan sürekli ayaktan periton diyalizi tedavisi alan 59 hasta ve çeşitli derecelerde kronik böbrek yetersizliği olan ancak henüz diyaliz tedavisine başlanmamış ve Nefroloji polikliniğince takip edilen 46 hasta, rastgele yöntemle önceki hepatit profiline bakılmaksızın çalışmaya alındı.

### 4.2. Örneklerin Toplanması ve Analize Hazırlanması

Tüm hastalardan periyodik aylık kontrolleri sırasında, HBV DNA saptanması, hepatit belirteçleri, AST ve ALT düzeylerinin belirlenmesi için üç ayrı tüpe 5'er ml periferik venöz kan örneği alındı.

Hepatit B ve C virus belirteçleri (HBsAg, HBeAg, anti-HBe, anti-HBc, anti-HBs, anti-HCV) Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda, ticari ELISA kitleri (Access and BioRad, Beckman-Coulter, California, USA) kullanılarak, hastaların rutin kontrolleri sırasında çalışıldı. Aynı şekilde, aspartat aminotransferaz (AST), alanin aminotransferaz (ALT), üre,

kreatinin değerleri tüm hastalarda rutin kontroller sırasında Olympus marka test kitleri kullanılarak Olympus AU 2700 otoanalizör (Olympus Optimal CO Ltd-Japan) ile Fırat Tıp Merkezi Biyokimya Laboratuvarı'nda ölçüldü. Aspartat aminotransferaz için normal değer aralıkları 8-33 U/L, alanin aminotransferaz için normal değer aralıkları 5-40 U/L olarak saptandı.

Alınan kan örnekleri, 2500 rpm'de 5 dakika süreyle santrifüj edildi. Elde edilen serumlar DNA izolasyonu yapılmaya kadar -20°C'de saklandı.

### **4.3. Kimyasal Maddeler, Sarf Malzemeleri ve Cihazlar**

DNA izolasyon kiti (GenElute, Sigma-Aldrich, USA), HBV primerleri (İontek, İstanbul, Türkiye), deoksinükleotid trifosfat (dNTP) seti (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) (Fermentas, USA), magnezyum klorür (Fermentas, USA), buffer (Fermentas, USA), Taq DNA polimeraz (Fermentas, USA), 100 bç'lik DNA ladder ağırlık markeri (Bio Basic, Canada), agaroz (Appllichem, Germany), etidyum bromür, bromfenol mavisi, xylene cyanol, alkol (Scharlau ET 006, Germany), elektroforez aparatı (Consort E833, Belgium), elektroforez tankı, fotoğraf makinesi UV lambası ve ilgili okuma, kaydetme, fotoğraflama ünitesi (TCP-20-M, Vilber Lourmat, Cedex, France), ısı bloğu (Major Science MD-02, Belgium), santrifüj cihazı (Hettich Zentrifugen Mikro 22R, Germany), PZR cihazı (AB Applied Biosystems 2720 Thermal Cyclers, Singapur), 10-100 ve 1000 µl pipetler (Medisis, İstanbul, Türkiye), ultraviyole transilluminatör (Vilber Lourmat, France), elektronik hassas terazi (Sartorius BÇ 410, Germany), hız ayarlı vortex (VELP Scientifica, Italy).

#### 4.4. DNA İzolasyonu

Tüm örneklerden Gen Elute Mammalian genomic DNA Miniprep Kiti ile, üretici firmanın önerileri doğrultusunda DNA izolasyonu yapıldı. İzolasyon protokolü şu şekilde uygulandı:

1. Serumlar  $-20\text{ C}^{\circ}$  den çıkarılarak oda ısısında erimeye bırakıldı. Eriyen serumlar vorteks cihazında hafifçe karıştırıldı.
2. 1.5 ml'lik nuclease-free mikrosantrifüj tüplerine 20  $\mu\text{l}$  proteinaz K solüsyonu kondu. Üzerlerine 200  $\mu\text{l}$ 'lik serum örneği eklendi. Enzimi karıştırmak amacıyla vortekslendi.
3. Bu sırada GenElute Miniprep bağlama kolonuna 50  $\mu\text{l}$  kolon hazırlama solüsyonu eklendi, 1 dakika süreyle 12000 devirde santrifüj edildi. Artan sıvı atıldı.
4. Üçüncü basamaktaki lizata 200  $\mu\text{l}$  %95-100'lük etanol eklendi, homojen solüsyon elde etmek için 5-10 saniye iyice vortekslendi.
5. Tüpteki tüm solüsyon dördüncü basamakta hazırlanmış olan bağlama kolonuna aktarıldı, 1 dakika 6500 rpm'de santrifüj edildi. Atık sıvı içeren koleksiyon tüpü atıldı ve bağlama kolonuna yeni bir 2 ml'lik koleksiyon tüpü kondu.
6. Bağlama kolonuna 500  $\mu\text{l}$  yıkama solüsyonu eklendi. 6500 rpm.de 1 dakika santrifüj edildi. Atık sıvı içeren koleksiyon tüpü atıldı ve bağlama kolonuna yeni koleksiyon tüpü kondu.
7. Tekrar 500  $\mu\text{l}$  yıkama solüsyonu bağlama kolonuna konarak 14000 rpm'de 3 dakika süreyle santrifüj edildi. Atık sıvı içeren koleksiyon tüpü atılıp yeni bir 2 ml'lik koleksiyon tüpü yerleştirildi.

8. 200 µl elüsyon solüsyonu bağlama kolonuna konuldu. Oda ısısında 5 dakika bekletilip 6500 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
9. Üstteki kolon atılarak, altta kalan mikrosantrifüj tüpü içerisindeki genomik DNA içeren sıvı alındı. PZR için kalıp DNA olarak kullanmak üzere -20 °C'de saklandı.

#### **4.5. Polimeraz Zincir Reaksiyonu**

Polimeraz zincir reaksiyonunda HBV'nin S gen bölgesine spesifik olan ve HbsAg'nin a determinantını çoğaltan, genomun 259 bç'lik bölümünü saptayan primerler kullanıldı. Bunlar; HBV primer 1 (sens; 5' CAA GGT ATG TTG CCC GTT TG 3') ve HBV primer 2 (antisens; 5' AAA GCC CTG CGA ACC ACT GA 3') primerleridir. PZR için; her bir 0.5 ml ependorf tüpe, örnek başına 5 µl buffer, 5 µl MgCl<sub>2</sub>, 4 µl dNTP (2.5 mM), her bir sense ve antisens primerden 2µl, 0.5 µl Taq DNA polimeraz ve 23.5 µl dH<sub>2</sub>O'dan oluşan PZR karışımı ve 10 µl örnek konularak toplam 50 µl üzerinden PZR kuruldu (84).

Polimeraz zincir reaksiyonu tüpleri cihaza yerleştirilerek ilk aşamada 94°C'de iki dakikalık bir döngüye tabi tutuldu. Daha sonra her bir döngü 94°C'de bir dakika, 52°C'de bir dakika, 72°C'de bir dakika olmak üzere toplam 36 döngü üzerinden gerçekleştirildi. Otuzaltı siklusun sonunda 72°C'de 10 dakika bekletmeyle PZR tamamlandı. DNA izolasyonu ve PZR esnasında, her aşamada negatif ve pozitif kontroller kullanıldı. Pozitif kontrol olarak laboratuardaki rutin çalışmalarda, HBV DNA yönünden pozitif olduğu tespit edilen serum örneklerine ait DNA'lar kullanıldı. Negatif kontrol olarak ise, steril distile su kullanıldı. Amplifikasyon sonrası elde edilen PZR ürünleri % 2'lik agaroz jelde elektroforezle yürütülerek ayırt edildi.

#### **4.6. Agaroz Jel Elektroforezi:**

Agaroz jelin yüzdesi, DNA büyüklüklerinin beklenen baz ağırlıklarına göre belirlendi. %2'lik agaroz jel hazırlamak için, 2 gr agaroz tartılarak 100 ml 1xTAE (Tris-asetik asit-EDTA) solüsyonunda kaynatılmak suretiyle eritildi. Bu solüsyonun stok şekli olan 50X tampon şu şekilde hazırlandı: 242 gr TRIS-base, 57.1 gr glacial asetik asit ve 100 ml 0.5 M EDTA (etilendinitrilotetraasetik asit, pH 8) 1 litre distile ve deiyonize suda çözüldü. Eriyen agaroz-TAE solüsyonu karışımı 60°C'ye soğutulduktan sonra, içine 10 µl etidyum bromür (5 mg/ml, stok şekli kullanıldı) eklendi. Sıvı halde olan jel, katılaşması için jel kalıbına döküldü.

Jelin ilk ve son kuyucuklarına gözlenmesi beklenen bant boyutlarının saptanabilmesi amacıyla 100 bç'lik DNA markeri yüklendi. Diğer kuyucuklara PZR ürünlerinden 10 µl alınıp 3 µl yükleme tamponu (%0.25 xylene cyanol FF, %30 glycerol) ile karıştırılarak yüklendi. Ürünler 150 V'da elektroforez edildi (85). Ultraviyole ışık altında, oluşan bantlar DNA ağırlık markeri ile kıyaslandı ve beklenildiği gibi 259 bç uzunluğunda tespit edilen bantlar HBV-DNA yönünden pozitif olarak değerlendirildi.

#### **4.7. İstatistiksel Analiz:**

Sonuçlar ortalama  $\pm$  standart sapma olarak verildi. Verilerin değerlendirilmesinde SPSS 12.00 paket programı kullanıldı. Hastalar arasındaki kategorik değişkenlerin karşılaştırılmasında Ki-kare testi, kategorik olmayan verilerin karşılaştırılmasında ise, Mann-Whitney U ve One-Way ANOVA testleri uygulandı.  $P < 0.05$  olan değerler, istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.



## 5. BULGULAR

Çalışmaya 81'i hemodiyaliz, 59'u periton diyalizi, 46'sı prediyaliz olmak üzere toplam 186 hasta alındı. Hemodiyaliz hastalarının 4'ünde, periton diyalizi hastalarının 5'inde ve prediyaliz hastalarının 3'ünde HBsAg pozitif olarak saptandı. HBsAg-pozitif hastalar çalışma dışında bırakıldı. Geriye kalan 174 hasta çalışmaya alındı. Bu hastaların genel özellikleri Tablo 2'de gösterilmiştir.

**Tablo 2.** Hastaların genel özellikleri

	Hasta değerleri	Normal değerler
Yaş (yıl)	49.9±17.3	---
Cinsiyet (K/E)	84/90	---
Hemoglobin (gr/dl)	11.3±3.2	12-16
Üre (mg/dl)	144.3±48.7	10-50
Kreatinin (mg/dl)	7.5±2,8	0,6-1.2
AST (U/L)	14.9±7.5	8-33
ALT (U/L)	14,3±9,8	5-40
Serum albumini (gr/dl)	3.9±0.44	3.5-5.3
Parathormon (pg/ml)	400.8±328.9	12-65
C-reaktif protein (mg/l)	5.5±4.1	0-5

Hasta grupları ayrı ayrı olarak incelendiğinde; hemodiyaliz ve periton diyalizi hastaları arasında yaş, cinsiyet, primer böbrek hastalığı, diyaliz süresi, üre, kreatinin, AST, ALT ve CRP değerleri açısından anlamlı fark yoktu ( $p>0.05$ ) (Tablo 3).

**Tablo 3.** Grupların genel özelliklerinin karşılaştırılması

	Hemodiyaliz (n=77)	Periton diyalizi (n=54)	Prediyaliz (n=43)
Yaş (yıl)	51.9±18.1	46.8±14.9	50.5±18.1
Cinsiyet (K/E)	40/37	19/35	25/18
Primer böbrek hastalığı			
Glomerüler hastalık	21	13	11
Diabetes mellitus	14	10	9
Hipertansiyon	12	8	6
Amiloidoz	3	1	-
Diğer/Bilinmeyen	27	22	17
Diyaliz süresi (ay)	48.5±41.5	42.9±44	---
Üre (mg/dl)	144.2±38.9	137.6±47.6	152.5±63.5
Kreatinin (mg/dl)	7.7±2.1	9.1±3.4	5.1±1.3*
AST (U/L)	16.0±6.7	13.7±5.3	15.1±9.8
ALT (U/L)	12.8±10.8	15.1±8.4	15.9±9.6
C-reaktif protein (mg/l)	4.9±3.3	6.7±4.5	5.1±4.8

AST: Aspartat aminotransferaz, ALT: Alanin aminotransferaz, CRP: C-reaktif protein

\*p<0.05, hemodiyaliz ve periton diyalizi hastalarına göre

Tüm hastalar dikkate alındığında HBsAg pozitiflik oranı %6.3 (12/189) olarak saptandı. Hepatit B yüzey antijeni-negatif hastalar arasında, polimeraz zincir reaksiyonu yöntemi ile HBV-DNA pozitiflik oranı %1.7 (3/174) olarak bulundu. Gizli hepatit B pozitifliği, hemodiyaliz hastalarında %2.6 (2/77), periton diyalizi hastalarında %1.8 (1/54) ve prediyaliz hastalarında ise %0 (0/43) olarak saptandı. HBV-DNA'nın pozitif bulunduğu her iki diyaliz grubunda da hastaların aynı zamanda izole anti-HBc pozitifliği (HBsAg negatif hastada anti-HBc pozitifliği) gösterdiği belirlendi (Tablo 4).

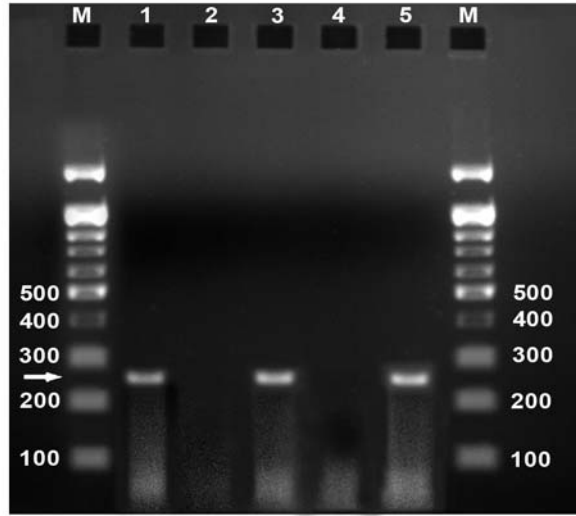
Hemodiyaliz hastalarının 35'inde, periton diyalizi hastalarının 12'sinde ve prediyaliz hastalarının 10'unda anti-HBs pozitif olarak saptandı. Bu oran tüm

hastalar için 57/174 (%32)'dir. Hasta grupları arasında hepatit B virüsün saptanan serolojik belirteçleri Tablo 4'de gösterilmiştir.

**Tablo 4.** Hasta grupları arasında hepatit belirleyicilerinin karşılaştırılması

	Hemodiyaliz n=81	Periton diyalizi n=59	Prediyaliz n=46
HBsAg pozitifliği	4	5	3
HBV DNA	2	1	-
Anti-HBc	21	26	2
İzole anti-HBc	5	3	1
HBV DNA	2	1	-
Gizli hepatit B	2/77	1/54	0/43
İzole anti-HBc	2	1	-
Anti-HCV pozitifliği	4	2	1

Hepatit B virusu yüzey antijeni negatif olan 174 hastanın serum örneklerinden yapılan PZR sonucunda elde edilen ürünler, 3 µl yükleme tamponu ile karıştırılarak, içine 10 µl etidyum bromür eklenmiş %2'lik agaroz jeldeki kuyucuklara yüklendi. Beklenen 259 baz çiftlik bant boyutlarının belirlenebilmesi amacıyla aynı jel üzerine ilk ve son kuyucuklara 100 baz çiftlik DNA markeri de yüklendi. Jel, 150 volt akımla çalışan elektroforez aparatı yardımıyla 15-20 dakika yürütüldü. Etidyum bromür ile boyanan DNA bantları DNA markeri ile kıyaslanarak UV transilluminatör cihazı ile değerlendirildi ve fotoğraflandı. 259 baz çifti ağırlığındaki HBV DNA pozitif polimeraz zincir reaksiyonu ürünleri şekil 4'te gösterilmiştir.



**Şekil 4.** HBV DNA pozitif örneklere ait PZR ürünlerinin %2'lik agaroz jel görüntüsü. M hatları: 100 bp'lik DNA moleküler ağırlık markeri; 1, 3, ve 5. hatlar pozitif olarak saptanan serum örnekleri (259 bp'lik bantlar); 2. hat: DNA ekstraksiyon negatif kontrolü; 4. hat: PZR negatif kontrolü.

Gizli HBV enfeksiyonu yönünden pozitif olan hastalarla negatif hastalar karaciğer enzimleri ve CRP düzeyleri yönünden karşılaştırıldı. Her iki grupta da ortalama AST ve ALT değerleri normal sınırlar içinde olmakla birlikte, gizli hepatit B pozitif hastalarda AST ve ALT düzeyleri daha yüksekti, ancak hasta sayısının az olmasının da etkisiyle anlamlı fark gözlenmedi ( $p>0.05$ ). Diyalize bağımlı olan hastalarda daha belirgin olmakla birlikte kronik böbrek yetersizliği olan hastalarda çeşitli sebeplere bağlı olarak gelişen mikroişlamasyonun belirteci olan CRP değerleri ise gizli hepatit B pozitif hastalarda daha yüksek görünürken, bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildi ( $p>0.05$ ) (Tablo5).

**Tablo 5.** Gizli hepatit B pozitif ve negatif hastaların genel özellikleri

	Gizli hepatit B pozitif (n=3)	Gizli hepatit B negatif (n=171)	p
Yaş (yıl)	43,6±8,3	50,1±17,3	>0.05
AST (U/L)	15±7,5	9,3±6,5	>0.05
ALT (U/L)	14,4±9,9	7,0±2,0	>0.05
CRP (mg/l)	8,5±6,2	5,5±4,2	>0.05

AST: Aspartat aminotransferaz, ALT: Alanin aminotransferaz, CRP: C-reaktif protein

## 6. TARTIŞMA

Hepatit B virus enfeksiyonunun bulaş yollarından en önemlisi kan ve kan ürünlerinin transfüzyonudur. Dolayısıyla, HBV diyaliz ortamında çok kolay yayılabilen bir viral etkidir. Tüm dünyada akut veya kronik hepatit, siroz ve hepatosellüler karsinomun en önemli nedeni olarak gösterilmektedir. Bundan yaklaşık 30 yıl kadar önce HBV enfeksiyonu diyaliz üniteleri için çok ciddi ve yaygın bir tehdit olarak görülüyordu. O günlerde bazı diyaliz merkezlerinde HBsAg prevalansı % 50'nin üzerindeydi. Amerika Birleşik Devletleri "Hastalıkları Kontrol Merkezi (CDC)"nin HBsAg-pozitif hastalar ile HBsAg-negatif hastaların farklı makinelerde diyalize alınması, enstrümanların ve personelin özel olması ve genel hijyen kurallarına uyulması gibi önerilerinin uygulanmasıyla hemodiyaliz ünitelerinde HBsAg prevalansı hızlı bir düşüş göstermiştir (86). Daha sonra, 1980'li yılların başında uygulamaya konulan HBV aşısı ile HBV enfeksiyonu, gelişmiş ülkelerdeki hemodiyaliz üniteleri için ciddi bir sorun olmaktan çıkmıştır. Ülkemiz için aynı iyimser tablodan bahsetmek kolay değildir. Türk Nefroloji Derneği Kayıt Sistemi raporlarına göre, 2004 yılında hemodiyaliz hastalarında HBsAg pozitifliği oranı % 4.9'dur (87). Bu hastalarda hepatit B prevalansının yüksek olmasında genel hijyenik kuralların yeterince uygulanamaması dışında immün direncin zayıf olması da önemli rol oynamaktadır. Buna bağlı olarak, hepatit B için aşılanan hemodiyaliz hastalarının sadece % 50-60'ında koruyucu antikor cevabı gelişmektedir (88).

Hemodiyaliz hastalarının, akut hepatit B enfeksiyonundan sonra kronik taşıyıcı olma ihtimali oldukça yüksektir. Bu oran diyaliz hastası olmayanlar için % 10 iken diyaliz hastalarında % 80'lere çıkmaktadır. Bunun yanında, HBV taşıyıcısı olan diyaliz hastalarında kronik karaciğer hastalığı gelişme riski de fazladır. Bir

çalışmada HBsAg-pozitif asemptomatik 75 diyaliz hastasına karaciğer biyopsisi yapılmış ve % 79'unda çeşitli derecelerde histopatolojik karaciğer hasarı olduğu gösterilmiştir (89). Buna bağlı olarak, birçok hasta böbrek nakli şansını kaybetmektedir. Çünkü organ nakli sonrası yoğun immünsüpresif tedavinin de katkısıyla siroz gelişebilmektedir. Ne yazık ki bu hastalar için etkili ve kesin bir tedavi yöntemi de yoktur (90). Sonuç olarak; diyaliz hastalarında HBV enfeksiyonlarının tespiti, önlenmesi ve tedavisi oldukça önem taşımaktadır.

Hemodiyaliz hastalarında HBsAg pozitifliği giderek azalmasına rağmen, spesifik ve sensitif PZR temelli HBV-DNA testleri ile HBsAg'nin negatif olduğu hastalarda HBV viremisi (gizli hepatit B) olduğu gösterilmiştir (91). Gizli hepatit B varlığının çeşitli hasta gruplarında prevalansı ve klinik önemi hakkında çalışmalar giderek artmaktadır. Biz de bu çalışmada hemodiyaliz hastalarında, gizli hepatit varlığını ve hepatit belirteçleri ile ilişkisini araştırdık. Buna ek olarak daha önce gizli hepatit prevalansı ile ilgili bir çalışmaya rastlamadığımız periton diyalizi hastalarında ve henüz diyaliz tedavisi başlanmamış kronik böbrek yetersizliği olan hastaları da çalışma kapsamına alarak bu grupları karşılaştırmayı planladık.

Gizli HBV enfeksiyonu ile ilgili bazı çalışmalara rağmen, gerçek prevalansı tam olarak saptanamamıştır. Bunun nedenlerinden birisi; gizli HBV enfeksiyonu kliniğinin oldukça geniş bir spektrumda görülebmesidir. Kronik asemptomatik taşıyıcılık olabildiği gibi, akut ve kendini sınırlayan hepatit B, siroz veya hepatosellüler kanser ile birlikte görülebilir. Diğer bir neden ise, çalışmaların çoğunda örnek sayılarının genellikle az olmasıdır. Çalışmalarla alınan popülasyon heterojen olup, kontroller eksiktir. Bu nedenlere ek olarak, enfeksiyonu tespit etmek için kullanılan yöntemlerin duyarlılığı değişkenlik göstermekte, yanlış pozitif ya da

yanlış negatif olgulara sık rastlanmaktadır. Bu nedenle yüksek duyarlı ve özgün PZR çalışmaları, gerçek prevalansın saptanması için önem arz eder (92).

HBV-DNA'nın enfeksiyon esnasında tespiti zamana bağımlıdır. Enfeksiyon boyunca HBV klirensi dalgalanmalar gösterebilir. Bu nedenle enfeksiyon prevalansı değerlendirilirken bu faktörlerin de göz önünde bulundurulması önem taşır (92).

1980'li yıllardan itibaren serolojik tanı yöntemlerinin yanı sıra moleküler tanı yöntemlerinin de kullanımı gündeme gelmiş ve HBV tanısı için çeşitli yöntemler geliştirilmeye başlanmıştır. Önceleri insan serum ve dokularında dot blot hibridizasyon veya sıvı ortamda gerçekleştirilen klasik hibridizasyon teknikleri kullanılarak HBV DNA'sı saptanmıştır. Fakat bu yöntemler, örnekte  $10^{4-5}$  kopya/ml'den daha az sayıda DNA varlığında genellikle yetersiz kalmaktadır. Bu sorunları aşmak için, PZR gibi ortamdaki nükleik asit miktarını saptanabilir düzeye kadar çoğaltacak yöntemler geliştirilmiştir. Bu yöntemlerle önceleri örnekte viral genomun varlığı kalitatif yönden araştırılmakta iken geliştirilen tekniklerle kantitatif olarak da miktar saptanmaya başlanmıştır. Hepatit B virus DNA'sının saptanması ve kantitasyonu amacıyla farklı yöntemler geliştirilmiştir. Test seçiminde belirleyici olan, gereksinim duyulan duyarlılık sınırı ve kantitasyon aralığıdır. HBsAg negatif enfeksiyonun tanısı (Gizli HBV) ve tedavi izlemi için yüksek duyarlılığa sahip test kullanımı gereklidir. Serum örneğinden DNA'nın ayrıştırılması, kullanılacak testin duyarlılığı, kullanılan total DNA miktarı ve PZR primerleri sonuçların güvenilirliği açısından çok önemlidir (63).

Çalışmamızda hedef nükleik asitlerin çoğaltılması esasına dayalı PZR yöntemi kullanılarak HBV DNA amplifikasyonu yapılmış, amplifikasyon sonrası elde edilen ürünler elektroforez cihazında %2'lik agaroz jelde yürütülerek UV ışık altında elde edilen bant profilleri değerlendirilmiştir. Bu değerlendirme sonucu



beklenildiği gibi 259 bç uzunluğundaki bantlar HBV DNA yönünden pozitif olarak kabul edilmiştir. Çalışmamızda PZR yöntemi ile gizli hepatit B oranı hemodiyaliz hastalarında %2.6, periton diyalizi hastalarında %1.8, prediyaliz hastalarda %0 olarak bulunmuştur. Çeşitli çalışmalarda hemodiyaliz hastalarında gizli HBV enfeksiyonunun oranı, ortalama olarak %14-36 aralığında bildirilmiştir (75,77,91). Altındış ve ark. hemodiyalize giren 153 hasta ile hiçbir zaman diyaliz tedavisi almamış 73 kişiden oluşan, hepsi HBsAg negatif olan toplam 226 bireyde gizli hepatit B varlığını gerçek zamanlı PZR yöntemi ile araştırmışlardır. Hemodiyaliz hastalarının %12.4'ünde, hemodiyaliz hastası olmayan ancak farklı serolojik profillere sahip bireylerin ise %6.8'inde HBV-DNA pozitifliği saptamışlardır (93). Bizim hemodiyaliz hastalarımızda saptadığımız gizli hepatit oranı literatürdeki sonuçlara göre daha düşük seviyelerdedir. Bununla birlikte HBsAg negatif hemodiyaliz hastalarında HBV-DNA pozitifliğinin çok düşük oranlarda bildirildiği çalışmalar da rapor edilmiştir. Fabrizi ve ark. 213 hemodiyaliz hastasını inceledikleri çok merkezli bir çalışmada hastaların hiçbirinde (%0) gizli hepatit B enfeksiyonu bulamamışlardır (94). Yakaryılmaz ve ark. bu oranı 188 hemodiyaliz hastasında 5 (%2.7); Minuk ve ark. ise 239 erişkin hemodiyaliz hastasında %3.8 olarak bildirmişlerdir (95,96). Kullanılan tekniğin duyarlılığı, hasta gruplarının büyüklüğü ve virolojik özelliklerin, oranlardaki bu farklılıklara neden olabileceği bildirilmiştir (91,97). Bunun dışında, çalışılan bölgedeki insan popülasyonunun HBV sıklığı bu farklılıkta rol oynayabilir. Çünkü, gizli hepatit B prevalansında coğrafik değişikliklerin de etkili olduğu dolayısı ile, HBV enfeksiyonu endemisi ile de çok yakından ilişkili olduğu bildirilmiştir (98).

Hepatit B ve C virusu ko-enfeksiyonu sık görülen klinik bir durumdur (99). Hepatit C virusuna bağlı kronik karaciğer hastalığı olanlarda HBV-DNA pozitifliği

HCV dışı sebeplere bağlı olanlara göre daha fazladır (76). Klinik önemi iyi anlaşılacakla birlikte, gizli HBV enfeksiyonlarının kronik hepatit C'li hastalarda daha sık olduğu bildirilmiştir (100). Diğer taraftan, HCV varlığının HBV replikasyonunu baskıladığını ileri süren çalışmalar da vardır (100,101). Altındış ve ark. hemodiyaliz hastalarında gizli hepatit B oranını %12.4, anti-HCV pozitif olan hemodiyaliz hastalarında ise %27.5 olarak belirlemişlerdir (93). Bu oranı Kao ve ark. %15 (31/210), Silva ve ark. %14 (15/106), Khattab ve ark. ise %7.5 (4/53) olarak bildirmişlerdir (100,102,103). Beşşik ve ark. HBsAg negatif, HCV-RNA pozitif kronik hepatit C'li 33 kronik hemodiyaliz hastasında HBV DNA PZR araştırması yapmış, 12 (%36.4) hastada pozitif sonuç elde etmişler ve kronik hepatit C'li hastalarda artmış gizli HBV enfeksiyonu insidansının önemli bir kısmından YMDD mutasyonun sorumlu olduğunu ileri sürmüşlerdir (75). Bunun aksine, Göral ve ark. HBsAg negatif, anti-HCV pozitif 50 kronik hemodiyaliz hastasında gizli hepatit B oranını %0 olarak bildirmiştir (104). Benzer bir sonuç Yakaryılmaz ve ark. tarafından da bildirilmiştir (95). Bizim çalışmamızda ise; muhtemelen anti-HCV- pozitif hastaların ayrı makine ve odalarda diyalize alınması, düzenli aylık takipler ve genel hijyenik kurallara titizlikle uyulması gibi nedenlerle anti-HCV pozitif hasta sayımız azdır, dolayısıyla bu verilerle HCV ve gizli HBV etkileşimi konusunda bir sonuç çıkarmak mümkün olmamıştır.

Gizli hepatit B ile ilişkisi araştırılan bir başka durum da anti-HBc pozitifliğidir. HBsAg'yi nötralize eden ve HBsAg'nin temizlenmesinden sonra ortaya çıkan anti-HBs, HBV enfeksiyonunun geçirilmesinden yıllar sonra kaybolabilmekte ve anti-HBc, geçirilmiş HBV enfeksiyonunu gösteren tek belirteç olarak kalabilmektedir. İzole anti-HBc (HBsAg-negatif hastada anti-HBc pozitifliği) varlığının klinik önemi non-üremik hastalarda olduğu gibi diyaliz hastalarında da

tam olarak bilinmemektedir. Bazı raporlarda anti-HBc pozitifliğinin enfeksiyöz bir potansiyele sahip olduğu ileri sürülmüştür. Kullanılan teste ve gerçek pozitif sonuçların prevalansına bağlı olarak, anti-HBc pozitifliğinin bir kısmının yanlış pozitif olabileceği gösterilmiştir (105). Carpenter ve ark., anti-HBc prevalansının anti-HCV pozitif hastalarda daha yüksek olduğunu göstermişlerdir (106). Yakaryılmaz ve ark., bu oranı %7.9 olarak bildirmişlerdir (95). Buna karşılık, Beşışık ve ark. anti-HCV pozitif hastaların hiçbirinde anti-HBc pozitifliği bulamamışlardır (75). Yine aynı yazarlar ve ayrıca Haushofer ve ark. tarafından anti-HBc seropozitifliği açısından gizli hepatit B enfeksiyonu olan ve olmayan hastalar arasında herhangi bir farklılık bulamamışlardır (75,95,107). Yakaryılmaz ve ark., tüm hastalarda anti-HBc pozitifliğini %44.7, izole HBc pozitifliğini %6.4 olarak bulmuşlar ve izole anti-HBc pozitifliğinin gizli hepatit B olanlarda daha yüksek olduğunu bildirmiştir (95). Bizim sonuçlarımıza göre hemodiyaliz hastalarının 21'inde (%27.2) periton diyaliz hastalarının 26 (%48.1)'sında ve prediyaliz hastaların 2 (%4.6)'sinde anti-HBc pozitifliği saptanmıştır. İzole anti-HBc pozitifliği oranı ise sırasıyla %6.5 (5/77), %5.5 (3/54) ve %2.3 (1/43)'dür ve gizli HBV enfeksiyonu olarak tanımladığımız hastaların hepsinde izole anti-HBc pozitifliği gözlenmiştir. Ancak, anti-HBc pozitifliği olan hastalarımızın hiçbirinde klinik olarak akut ikterik hepatit öyküsü alınamamıştır. Uzun süreler önce veya erken çocukluk döneminde enfeksiyonun alınması bu durumun olası nedenleri olarak düşünülebilir. Diğer taraftan akut HBV'nin subklinik seyredebileceği de unutulmamalıdır (108).

Hastalarımızın %32'sinde anti-HBs pozitif olup bunların hiçbirinde HBV-DNA pozitifliği gözlenmemiştir. Genel bilgi olarak antijenleri negatifleşmiş, anti-HBs ve anti-HBc antikorları oluşmuş kişilerde enfeksiyonun sona erdiği

düşünülmektedir. Bu çalışmamızda elde ettiğimiz bulgular da bu görüşü desteklemiştir. Ancak, anti-HBs'nin pozitif olması her zaman iyileşme anlamına gelmemektedir. Nadiren HBsAg-negatif ve anti-HBs-pozitif olan hastalarda da HBV-DNA varlığı gösterilmiştir (80,81). Nedeni tam olarak bilinmemekle birlikte, gizli HBV'li hemodiyaliz hastalarında, anti-HBs'nin varlığı, HBV'nin yetersiz nötralizasyonunu ve rutin serolojik profilin HBV enfeksiyonunun durumunu tanımlamada her zaman için tek başına yeterli olmayabileceğini düşündürmektedir.

Aktif viral replikasyonun olduğu HBsAg-pozitif diyaliz hastalarında karaciğer hasarının daha fazla olduğu ve serumda HBV-DNA varlığının aminotransferaz aktivitesinin güçlü ve bağımsız bir belirleyicisi olduğu daha önce gösterilmiştir (109). Yakaryılmaz ve ark. yaptıkları çalışmada HBV viremisi olan ve olmayan hastaları karşılaştırdıklarında AST ve ALT düzeylerinin benzer olduğunu görülmüştür (95). Bizim çalışmamızda ise; HBV viremisi olan hastaların ALT düzeyleri HBV DNA-negatiflere göre daha yüksek ( $14,4 \pm 9,9$  U/L vs  $7,0 \pm 2,0$  U/L) saptanmış olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı bir yükseklik olarak bulunmamıştır ( $p > 0.05$ ). Çalışmamızda saptanan gizli HBV enfeksiyonu sayısının azlığı bu bilginin değerlendirilmesinde yeterli olmamakla birlikte, serum aminotransferaz düzeyleri hemodiyaliz hastalarında gizli hepatit B enfeksiyonu için uygun bir tarama metodu olmayacağı düşünülmüştür. Ancak diyalize bağımlı olan hastalarının %10-90'ında veya henüz diyaliz tedavisine başlanmamış kronik böbrek yetersizliği olan hastalarda nedeni tam olarak bilinmeyen şekilde serum aminotransferaz düzeyleri non-üremik hastalara göre daha düşüktür. Bu nedenle, normalinin üst sınırının % 10-20 üstünde bir değer ya da normal-üst sınırlar içinde belirgin bir enzim düzeyi artışı olası hepatit B ve C enfeksiyonlarını akla getirmelidir (110,111).

Gizli hepatit B enfeksiyonunun çeşitli klinik durumlardaki önemi, özellikle diyaliz hastalarındaki sonuçları hakkındaki çalışmalar hala güncelliğini korumaktadır. HBsAg negatif kişilerde kan tansfüzyonu ile HBV'nin geçişi yaklaşık 20 yıldır bilinmektedir (78). Gizli HBV enfeksiyonunun buna katkısının olduğu çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir. Gizli HBV enfeksiyonunun klinik sonuçları ile ilgili olarak organ nakli yapılan hastalarda da önemli çalışmalar yapılmaktadır. Gizli HBV enfeksiyonlu vericilerden nakil sonrası HBV geçiş riski, %25-94 arasındadır (112). HBsAg negatif, anti-HBs pozitif bir hastada böbrek transplantasyonu sonrasında yeni bir (*de-novo*) HBV enfeksiyonu geliştiği bildirilmiştir. Retrospektif olarak yapılan incelemede hastanın nakil öncesi serumunda HBV-DNA'nın PZR ile pozitif olduğu gösterilmiştir (113). Bunların dışında, gizli HBV enfeksiyonunun bazı hastalarda karaciğerde hafif düzeyde kronik hasara neden olduğu ileri sürülmüştür (73). Son olarak, sadece HCV enfeksiyonu olan hastalarla, HCV ile birlikte gizli HBV enfeksiyonu olanlar, HSK gelişim süresi açısından karşılaştırıldıklarında; gizli HBV enfeksiyonu olanlarda daha erken sürede HSK geliştiği görülmüştür (114).

Çalışmamızdaki 59 Periton diyalizi hastasının 5 (%8.4)'inde HBsAg pozitifliği bulunurken, bu hastaların sadece birisinde HBV-DNA pozitif bulunmuştur. HBsAg negatif olan 54 hastadan 1 (%1.8)'inde HBV-DNA pozitif olarak saptanmıştır. Prediyaliz dönemdeki hastalarımızda ise bu oran %0'dır.

Çalışmamızda periton diyalizinde HBsAg pozitifliği daha yüksek bulunmuştur. Bununla birlikte periton diyalizi hastalarında evde izole koşullarda diyaliz yapılması, transfüzyon ihtiyacının daha az olması, damar giriş yolu gerektirmemesi gibi nedenlerden dolayı HBV enfeksiyonlarının prevalansı daha düşük olarak bildirilmektedir. Son dönem böbrek yetersizliği olan hastalarda renal replasman tedavisine periton diyalizi ile başlanarak devam edilmesi viral hepatit

riskini azaltmaktadır (115). Ayrıca, hepatit B aşısına periton diyalizi hastalarında daha iyi sonuç alındığına dair raporlar da vardır. Svac ve ark. 10 mIU/L'nin üstündeki pozitif aşı cevabı oranını hemodiyaliz hastalarında %34, periton diyalizi hastalarında ise %53 olarak tespit etmişlerdir (p=0.03) (116). Prediyalitik kronik böbrek yetmezliği hastalarında aşılama cevap hem daha erken hem de daha yüksek konsantrasyonlarda olmaktadır (117). Buna karşılık, her iki diyaliz tipinde ve prediyaliz hastalarında benzer cevap alındığına dair çalışmalar da yayınlanmıştır (88,118). Doğukan ve ark.nın yaptıkları bir çalışmada total serokonversiyon oranı %78 olarak bildirilmiştir. Bu çalışmaya göre, aşı cevabı prediyaliz ve periton diyalizi hastalarında (%80 ve %82), hemodiyaliz hastalarına (%75) göre daha yüksek bulunmasına rağmen aradaki fark istatistiksel anlamlılığa ulaşmamıştır. Periton diyalizi ve prediyaliz hastalarında nispeten daha yüksek olan bu sonuçlar, bu hastaların hücrel immün cevaplarının hemodiyaliz hastalarına göre daha iyi olmasına bağlanabilir (119). Dolayısıyla, çalışmamızda bu grup hastalarda (periton diyalizi ve prediyaliz) gizli hepatit B enfeksiyonunun görülmemesinin kan yoluyla bulaşma gibi nedenlerin dışında bir diğer nedeni de hücrel immüitedeki farklılıklardan kaynaklandığı düşünülmektedir.

Sonuç olarak çalışmamızda, HBsAg negatif hemodiyaliz hastalarında % 2.6, periton diyalizi hastalarında %1.8 oranında gizli HBV enfeksiyonu saptanmıştır. Bu hastaların bulaştırıcılık özellikleri de göz önüne alındığında, HBV negatif hastalara diyaliz yoluyla virusun bulaştırılması kaçınılmaz görülmektedir. Bu ise kronik böbrek yetmezliği nedeniyle hayat kalitesi belirgin düzeyde düşmüş olan diyaliz hastalarında morbidite ve mortaliteyi yükseltebilecek önemli bir risk oluşturacaktır. Gizli hepatit B enfeksiyonunun tanısında anahtar test HBV-DNA'nın saptanması olduğu için kullanılan teknik ve yöntemin standardizasyonu çok önemlidir. Diyaliz

unitelerine başvuran hastalarda en azından ilk başvuru sırasında PZR tabanlı bir yöntemle viral DNA araştırması yapılması ileride gelişebilecek sağlık sorunlarının engellenmesi açısından faydalı olabilir. Bu konuda daha kapsamlı çalışmalara duyulan gereksinim devam etmektedir.

## 7. KAYNAKLAR

1. Zhang YY, Guo LS, Li L, Zhang YD, Hao LJ, Hansson BG, Nordenfelt E. Hepatitis B virus DNA detected by PCR in sera and liver tissues of Chinese patients with chronic liver diseases *Chin Med J* 1993;106:7-12.
2. Chan HLY, Lok ASF. Hepatitis B in adults. A clinical perspective. *Clin Liver Dis* 1999;3:291–307.
3. Lee WM. Hepatitis B virus infection. *N Engl J Med* 1997;337:1733–1745
4. Hu KQ. Occult hepatitis B virus infection and its clinical implications. *J Viral Hepatol* 2002 ;9:243–257.
5. Ergünay K. Gizli (Okült ) Hepatit B Enfeksiyonu. *Mikrobiyol Bült* 2005; 39: 241-249.
6. Torbenson M, Thomas DL. Occult hepatitis B. *Lancet Infect Dis* 2002;2:479-486.
7. Minuk GY, Sun DF, Uhanova J, Zhang M, Caouette S, Nicolle LE, et al. Occult hepatitis B virus infection in a North American community-based population. *J Hepatol* 2005;42:480-485.
8. Tassopoulos NC, Kuhns MC, Koutelov MG, McNamara AI, Todoulos A, Quantitative detection of hepatitis B virus DNA in sera from patients with acute hepatitis B. *Dig Dis Sci* 1993; 38: 2156-2162.
9. Blumberg BS, Alter HJ, Visnich S. A new antigen in leukemia sera. *JAMA* 1965;191:541–546.
10. Dane DS, Cameron CH, Briggs M. Virus-like particles in serum of patients with Australia antigen-associated hepatitis. *Lancet* 1970;1: 695–698.
11. Bilgiç A, Özacar T. Hepatit B virus. Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M (editörler). *İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi Cilt 2, İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 2002: 1350-1370.*
12. Eroğlu C. Hepatit B virusu enfeksiyonlarının hücre kültürü ve hayvan modelleri. *Viral Hepatit 2007, Tabak F, Balık İ, Tekeli E. (editörler). İstanbul, Oban Matbaası, 2007:160-178.*
13. Bozdayı AM. Hepatit B virusu: virolojik özellikler, genotipler, klinik önemi. Çakaloğlu Y, Ökten A (editörler). *Hepatit B: Ulusal Uzlaşma Toplantı Metinleri. İstanbul, Medikal Yayıncılık, 2004:11-27.*



14. Tünger A, Çavuşoğlu C, Korkmaz M (editörler). Mikrobiyoloji. Hepatit virüsleri. 4.Baskı, İzmir, Asya Tıp Kitabevi, 2005: 402-419.
15. Bruss V. Envelopment of the hepatitis B virus nucleocapsid. *Virus Res* 2004;106:199–209.
16. Ustaçelebi Ş, Ergünay K. Hepatit B virusunun moleküler virolojisi. Tabak F, Balık İ, Tekeli E (editörler). *Viral Hepatit 2007*, İstanbul, 1.Baskı, Oban Matbaası, 2007:96-107.
17. Kann M, Lu X, Gerlich WH. Recent studies on replication of hepatitis B virus *J Hepatol* 1995;22:9-22.
18. Lau JY, Wriehl TL. Molecular virology and pathogenesis of hepatitis B. *Lancet* 1993;342:1335-1340.
19. Thomas HC, Carman WF. Envelope and precore/core variants of hepatitis B virus. Martin PM, Friedman LS (editors). *Viral Hepatitis, Gastroenterol Clin North Am* 1994;23:499-514.
20. Badur S. Viral hepatitler. Ustaçelebi Ş, Abacıoğlu H, Badur S (editörler). *Moleküler, Klinik ve Tamsal Viroloji*, Ankara, Güneş Kitabevi, 2004;175-202.
21. Prince AM, Lee DH, Brotman B. Infectivity of blood from PCR-positive, HBsAg-negative, anti-HBs-positive cases of resolved hepatitis B infection. *Transfusion* 2001;41:329-332.
22. Ou JH, Yeh CT, Yen TS. Transport of hepatitis B virus precore proteins into the nucleus after cleavage of its signal peptide *J Virol* 1989;63:5238-5243
23. Hatzakis A, Magiorkinis E, Haida C. HBV virological assessment. *J Hepatol* 2006;44:71-76.
24. Bahn A, Hilbert K, Martine U, Westendt J, Von Weiz Sacker F, Wirth S. Selection of a precore mutant after vertical transmission of different hepatitis B virus variants is correlated with fulminant hepatitis in infants. *J med Virol* 1995;47:336-341.
25. Geissler M, Tokushige K, Chante CC, Zurawski VR, Wandz JR. Cellular and humoral immune response to hepatitis B virus structural proteins in mice after DNA-based immunization. *Gastroenterology* 1997;112:1307-1320.

26. Eyigün CP. Hepatit B virusu mutasyonlarının klinik önemi ve tedaviye etkileri. Tabak F, Balık İ, Tekeli E (editörler). Viral Hepatit 2007, İstanbul, Oban Matbaası, 2007:136-147.
27. Stuyver LJ, Locarnini SA, Lok A, Richman DD, Carman WF, Dienstag JL, Schinazi RF. Nomenclature for antiviral-resistant human hepatitis B virus mutations in the polimerase region. *Hepatology* 2001;33:751-757.
28. Tong S. Mechanism of HBV genome variability and replication of HBV mutants. *J Clin Virol* 2005;34:134-138.
29. Feitelson MA, Duan LX, Guo J, Blumberg BS. X region deletion mutants associated with surface antigen-positive hepatitis B virus infection. *Gastroenterology* 1995;108:1810-1819.
30. Cooper A, Paran N, Shaul Y. The earliest steps in hepatitis B virus infection. *Biochim Biophys Acta* 2003;1614:89-96.
31. Lazizi Y, Pillot J. Delayed clearance of HBV-DNA detected by PCR in the absence of replication. *J Med Virol* 1993;39:208-213.
32. Locarnini S. Molecular virology of hepatitis B virus and the development of antiviral drug resistance. *Liver International* 2006; 26: 11-22.
33. Ganem D, Prince AM. Hepatitis B virus infection. Natural history and clinical consequences. *N Engl J Med* 2004;350:1118-1129.
34. Leblebicioğlu H, Eroğlu C. Acute hepatitis B virus infection in Turkey: Epidemiology and genotype distribution. *Clin Microbiol Infect* 2004;10:537-541.
35. Gültaş N, Abacıoğlu H. Hepatit B virus genotiplerinin S geninin nükleotid dizi analizi ve RFLP yöntemleriyle belirlenmesi. XXX. Türk Mikrobiyoloji Kongresi, Antalya, Türkiye, 2002.
36. Lemon SM, Thomas DL. Vaccines to prevent viral hepatitis. *N Engl J Med* 1997;336:196-204.
37. Magnus LO, Norder H. Subtypes, genotypes and molecular epidemiology of the hepatitis B virus as reflected by sequence variability of the S-gene. *Intervirology* 1995; 38: 24-34.
38. Kidd-Ljunggren K, Miyakawa Y, Kidd AH. Genetic variability in hepatitis B viruses. *J Gen Virol* 2002;83:1267-1280.

39. Gunther, Fischer L, Pult I, Sterneck M, Will H. Naturally occurring variants of hepatitis B virus. *Adv Virus Res* 1999; 52: 25-137.
40. Weber B, Melchior W, Gehrke R, Doerr HW, Berger A, Rabenau H. Hepatitis B virus markers in anti-HBc only positive individuals. *J Med Virol* 2001; 64: 312-319.
41. Carman WF, Zanetti AR, Karayiannis P, Waters J, Manzillo G, Tanzi E, et al. Vaccine induced escape mutant of hepatitis B virus. *Lancet*, 1990: 336; 325-329.
42. Singh H, Pradhan M, Singh RL, Phadke S, Naik SR, Aggarwal R, Naik S. High frequency of hepatitis B virus infection in patient with beta-thalassemia receiving multiple transfusions. *Vox Sang*, 2003; 84: 292-299.
43. Marinos G, Torre F, Günther S, Thomas MG, Will H, Williams R, Naoumov NV. Hepatitis B virus variants with core gene deletions in the evolution of chronic hepatitis B infection. *Gastroenterology*. 1996;111(1):183-192.
44. Kılıçturgay K. Hepatit B virusunda mutasyon ve getirdiği sorunlar. *Viral Hepatit Derg.* 1995;1:1-7.
45. Cacciola I, Pollicino T, Squadrito G, Cerenzia G, Villari D, de Franchis R, et al. Quantification of intrahepatic hepatitis B virus (HBV) DNA in patients with chronic HBV infection. *Hepatology* 2000;31:507-512.
46. Yeh CT, Chien RN, Chu CM, Liaw YF. Clearance of the original hepatitis B virus YMDD-motif mutants with emergence of distinct lamivudine-resistant mutants during prolonged lamivudine therapy. *Hepatology* 2000;31:1318-1326.
47. Mccaughan GW, Spencer J, Koorey D, Bowden S, Bartholomeusz A, Littlejohn M, et al. Lamivudine therapy in patients undergoing liver transplantation for hepatitis B virus precore mutant-associated infection: high resistance rates in treatment of recurrence but universal prevention if used as prophylaxis with very low dose hepatitis B immune globulin. *Liver Transpl Surg.* 1999; 5: 512-519.
48. Uchida T, Saitoh T, Shinzawa H. Mutations of the X region of hepatitis B virus and their clinical implications. *Pathol Int* 1997;47:183-193.

49. Özdemir D, Kurt H. Hepatit B virusu enfeksiyonlarının epidemiyolojisi. Tabak F, balık İ, Tekeli E (editörler). Viral Hepatit 2007, İstanbul, Oban Matbaası,2007:108-117.
50. Alter MJ. Epidemiology of hepatitis B in Europe and worldwide. J Hepatol. 2003;39:64-69.
51. Blumberg BS. The curiosities of hepatitis B virus: prevention, sex ratio, and demography. Proc Am Thorac Soc. 2006;3:14-20.
52. Lavanchy D. Worldwide epidemiology of HBV infection, disease burden, and vaccine prevention J Clin Virol. 2005;34:1-3.
53. Erdem S, Büyüköztürk S, Çalangu S, Yılmaz G, Palandüz S, Badur S. A study of serological markers of hepatitis B and C viruses in Istanbul, Turkey. Med Princ Pract 2003;12:184-188.
54. Akbulut A, Kılıç SS, Kalkan A, Papila Ç. Elazığ ili ve yöresinde hepatit B prevalansının araştırılması. Viral Hepatit Derg 1995; 1: 29-33.
55. Akarca US. Hepatit B virusu enfeksiyonu, doğal seyri. Çakaloğlu Y, Ökten A (editörler) Hepatit B:Ulusal Uzlaşma Toplantı Metinleri, İstanbul, İstanbul Medikal Yayıncılık, 2004: 65-75.
56. McMahon BJ, Alward WL, Hall DB, Heyward WL, bender TR, Francis DP, Maynard JE. Acute hepatitis B virus infection: relation of age to the clinical expression of disease and subsequent development of the carrier state. J Infect Dis 1985; 151: 599-603.
57. Hyams KC. Risks of chronicity following acute hepatitis B virus infection: a review. Clin Infect Dis. 1995;20: 992-1000.
58. Pontisso P, Ruvoletto MG, Fattovich G, Chemello L, Gallorini A, Ruol A, Alberti A. Clinical and virological profiles in patients with multiple hepatitis virus infection. Gastroenterology 1993;105:1529-1533.
59. Gitlin N. Hepatitis B: Diagnosis, prevention, and treatment. Clin Chem 1997;43:1500-1506.
60. Lok AS, McMahon BJ. AASLD Practice Guidelines: Chonic hepatitis B. Hepatology 2001; 34:1225-1241.
61. Taşyaran MA. Hepatit B virus enfeksiyonunda klinik. Tabak F, Balık İ, Tekeli E (editörler). Viral Hepatit 2007, İstanbul, Oban Matbaası,2007:118-122.

62. Akdoğan M. Viral hepatit ve hepatosellüler kanser. Tabak F, Balık İ, Tekeli E (editörler). Viral Hepatit 2007, İstanbul, Oban Matbaası,2007:390-401.
63. Özsan M, HBV enfeksiyonunda mikrobiyolojik tanı. Tabak F, Balık İ, Tekeli E (editörler). Viral Hepatit 2007, İstanbul, Oban Matbaası,2007:124-134.
64. Sayiner AA. Tanı ve tedavide kullanılan testler ve standardizasyon (HBV DNA). Çakaloğlu Y, Ökten A (editörler) Hepatit B:Ulusal Uzlaşma Toplantı Metinleri, İstanbul, İstanbul Medikal Yayıncılık, 2004:43-55.
65. Mackay IM, Arden KE, Nitsche A. Real-time PCR in virology. Nucleic Acids Res 2002; 30: 1292-1305.
66. Allain JP. Occult Hepatitis B virus infection. Transfus Clin Biol 2004; 11: 18-25.
67. Zaaijer HL, Borg FT, Cuypers HTM, Hermus MC, Leie PN. Comparison of methods for detection of hepatitis B virus DNA. J Clin Microbiol 1994;32:2088-2091.
68. Weinberger KM, Bauer T, Böhm S, Jilg W. High genetic variability of the group-specific a-determinant of hepatitis B virus surface antigen (HBsAg) and the corresponding fragment of the viral polymerase in chronic virus carriers lacking detectable HBsAg in serum. J Gen Virol 2000; 81: 1165-1174.
69. Carman WF. The clinical significance of surface antigen variants of hepatitis B virus. J Viral Hepatol 1997; 4: 11-20.
70. Brechot C, Hadchouel M, Scotto J, Fonck M, Potet F, Vyas GN, Tiollais P. State of hepatitis virus DNA in hepatocytes of patients with hepatitis B surface antigen–positive and negative liver diseases. Proc Natl Acad Sci USA 1981;78:3906-3910.
71. Matzusaki Y, Chiba T, Hadama T, Asaoka H, Doy M, Shoda J, et al. HBV genome integration and genetic instability in HBsAg-negative and anti-HCV-positive hepatocellular carcinoma in Japan. Cancer Lett 1997;119:53-61.
72. Bouffard P, Lamelin JP, Zoulim F, Pichoud C, Trepo C. Different forms of hepatitis B virus DNA and expression of HBV antigens in peripheral blood mononuclear cells in chronic hepatitis B. J Med Virol 1990;31:312-317.

73. Blackberg J, Kidd-Ljunggren K. Occult hepatitis B virus after acute self-limited infection persisting for 30 years without sequence variation. *J Hepatol* 2000;33:992-997.
74. Joller-Jemelka HI, Wicki AN, Grob PJ. Detection of HBs antigen in “anti-HBc alone” positive sera. *J Hepatol* 1994;21:269-272.
75. Beşışık F, Karaca C, Akyüz F, Horosanli S, Onel D, Badur S, et al. Occult HBV infection and YMDD variants in hemodialysis patients with chronic HCV infection. *J Hepatol* 2003;38:506-510.
76. Cacciola I, Pollicino T, Squadrito G, Cerenzia G, Orlando ME, Raimondo G. Occult hepatitis B virus infection in patients with chronic hepatitis C liver disease. *N Engl J Med* 1999;341:22-26.
77. Dueymes JM, Bodenes-Dueymes M, Mahe JL, Herman B. Detection of hepatitis B viral DNA by polimerase chain reaction in dialysis patients. *Kidney Int* 1993;41:161-166.
78. Hoofnagle JH, Seef LB, Bales ZB, Zimmerman HJ. Type B hepatitis after transfusion with blood containing antibody to hepatitis B core antigen. *N Eng J Med* 1978; 298: 1379-1383.
79. Xunrong L, Yan AW, Liang R, Lau GK. Hepatitis B virus reactivation after cytotoxic or immunosuppressive therapy-pathogenesis and management. *Rev Med Virol* 2001;11:287-299.
80. Tanaka Y, Esumi M, Shikata T. Persistence of hepatitis B virus DNA after serological clearance of hepatitis B virus. *Liver* 1990;10:6-10.
81. Fukuda R, Ishimura N, Niigaki M, Hamamoto S, Satoh S, Tanaka S, et al. Serologically silent hepatitis B virus coinfection in patients with hepatitis C virus-associated chronic liver diseases:clinical and virological significance. *J Med Virol* 1999;58:201-207.
82. Lorient MA, Marcellin P, Bismuth E, Martinot-Peignoux M, Boyer N, Degott C, et al. Demonstration of hepatitis B virus DNA by polymerase chain reaction in the serum and the liver after spontaneous or therapeutically induced HbeAg to anti-HBe or HBsAg to anti-HBs seroconversion in patients with chronic hepatitis B. *Hepatology* 1992;15:32-36.

83. Akyüz F, Beşışık F. Okült HBV İnfeksiyonu. Çakaloğlu Y, Ökten A (editörler) Hepatit B:Ulusal Uzlaşma Toplantı Metinleri, İstanbul, İstanbul Medikal Yayıncılık, 2004:77-89.
84. Ağaçayak A, Yılmaz S, Bulut Y, Özdamendeli A, Seyrek A. Investigation of HBV DNA obtained from sera and semen in hepatitis B carriers. *Viral Hepatit Dergisi* 2004; 9: 130-134.
85. Aşçı Z, Akbulut A, Doymaz MZ, Felek S, Kılıç SS. Evaluation of DNA of hepatitis B virus in serum by PCR and comparison with serological parametres. *Viral Hepatit Derg* 1996; 4: 96-103.
86. Boyacıoğlu S. Hemodiyaliz ve böbrek naklinde hepatitis B virus enfeksiyonu. Kronik B ve delta hepatiti tanı ve tedavisi 'ulusal uzlaşma toplantısı' III.Ulusal Hepatoloji Kongresi Kitabı 1999:50-58.
87. Erek E, Serdengeçti K, Süleymanlar G. Registry of the Nephrology, Dialysis and Transplantation in Turkey: Registry 2004. İstanbul, Art Ofset, 2005:19.
88. Doğukan A, Taşkapan H, Güven M, Tokgöz B, Oymak O, Utaş C. Prediyaliz, hemodiyaliz ve sürekli ayaktan periton diyalizi hastalarında çift doz hepatit B aşısına yanıt. *Türk Nefroloji Diyaliz Hipertansiyon ve Transplantasyon Dergisi* 1999;4:192-194.
89. Fabrizi F, Martin P. Hepatitis B virus infection in dialysis patients. *Am J Nephrol* 2000;20:1-11.
90. Mathurin P, Mouquet C, Poynard T, Sylla C, Benalia H, Fretz C, et al. Impact of B and C virus on kidney transplantation outcome. *Hepatology* 1999;29:257-263.
91. Cabrerrizo M, Bartolome J, De Sequera P, Caramelo C, Carreno V. Hepatitis B virus DNA in serum and blood cells of hepatitis B surface antigen-negative hemodialysis and staff. *J Am Soc Nephrol* 1997;8:1443-1447.
92. Khristova M, Nainan O, Xia GL. False-positive HBV DNA results among persons with only antibody to hepatitis B core antigen. *Antiviral Ther* 2000;5:
93. Altındış M, Uslan İ, Çetinkaya Z, Yüksel S, Çiftçi IH, Demirtürk N, et al. Hemodiyaliz hastalarının gizli hepatit B varlığı yönünden araştırılması. *Mikrobiyol Bült* 2007;41:227-233.

94. Fabrizi F, Messa PG, Lunghi G, Aucella F, Bisegna S, Mangano S, et al. Occult hepatitis B virus infection in dialysis patients: a multicentre survey. *Aliment Pharmacol Ther* 2005;21:1341-1347.
95. Yakaryilmaz F, Gurbuz OA, Guliter S, Mert A, Songur Y, Karakan T, Keles H. Prevalence of occult hepatitis B and hepatitis C virus infections in Turkish hemodialysis patients. *Ren Fail* 2006;28:729-735.
96. Minuk GY, Sun DF, Greenberg R, Zhang M, Hawkins K, Uhanova J, et al. Occult hepatitis B virus infection in a North American adult hemodialysis patient population. *Hepatology* 2004;40:1072-1077.
97. Cabrerizo M, Bartolome J, Caramelo C, Barril G, Carreno V. Molecular analysis of hepatitis B virus DNA in serum and peripheral blood mononuclear cells from hepatitis B surface antigen-negative cases. *Hepatology* 2000;32:116-123.
98. Grob P, Jilg W, Bornhak H, Gerken G, Gerlich W, Günther S, et al. Serological pattern “anti- HBc alone”: report on a workshop. *J Med Virol* 2000; 62: 450-455.
99. Sheen IS, Liaw YF, Chu CM, Pao CC. Role of hepatitis C virus infection in spontaneous hepatitis B surface clearance during chronic hepatitis B virus infection. *J Infect Dis* 1992;165:831-834.
100. Khattab E, Chemin I, Vuillermoz I, Vieux C, Mrani C, Guillaud O, et al. Analysis of HCV co-infection with occult hepatitis B virus in patients undergoing IFN therapy. *J Clin Virol* 2005;33:150-157.
101. Shih CM, Lo SJ; Miyamura T, Chen SY, Lee YH: Suppression of hepatitis B virus expression and replication by hepatitis C virus core protein in HuH-7 cells. *J Virol* 1993;67:5823-5832.
102. Kao JH, Chen PJ, Lai MY, Chen DS: Occult hepatitis B virus infection and clinical outcomes of patients with chronic hepatitis C. *J Clin Microbiol* 2002;1:4068-4071.
103. Silva C, Goncales NS, Pereira JS, Escanhoela CA, Pavan MH, Goncales FL. The influence of occult infection with hepatitis B virus on liver histology and response to interferon treatment in chronic hepatitis C patients. *Braz J Infect Dis* 2004; 8: 431-439.



104. Goral V, Ozkul H, Tekes S, Sit D, Kadiroglu AK. Prevalence of occult HBV infection in haemodialysis patients with chronic HCV. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 3420-3424.
105. Ihara H, Kato T, Ikeda H, Sekiguchi S. Evaluation of HI method as an anti-HBc screening test. *Jpn J Transfus Med* 1990;36:56-61.
106. Carpenter PA, Huang ML, McDonald GB. Activation of occult hepatitis B from seronegative patient after hematopoietic cell transplant: a cautionary tale. *Blood* 2002;99:4245-4246.
107. Haushofer AC, Hauer R, Brunner H, Köller U, Trubert-Exinger D, Halbmayer WM, et al. No evidence of hepatitis B virus activity in patients with anti-HBc antibody positivity with or without anti-hepatitis C virus antibody positivity. *J Clin Virol* 2004;29:221-223.
108. Abdelmalek MF, Pahsa TM, Zein NN, Persing DH, Wiesner RH, Douglas DD. Subclinical reactivation of hepatitis B virus in liver transplant recipients with past exposure. *Liver Transpl* 2003;9:1253-1257.
109. Fabrizi F, Mangano S, Alongi G, Bisegna S, Finazzi S, Lunghi G, Ponticelli C. Influence of hepatitis B virus viremia upon serum aminotransferase activity in dialysis population. *Int J Artif Organs* 2003;26:1048-1055.
110. Chang BS, Barnes RV, Port EK. Transaminase levels in azotemia. *Ann Intern Med* 1976;85:255-257.
111. Mondelli MU, Smedile V, Piazza V, Villa G, Barbieri C, Gattarello G, et al. Abnormal alanine aminotransferase activity reflects exposure to hepatitis C virus haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 1991;6:480-483.
112. Chazouilleres O, Mamish D, Kim M, Carey K, Ferrell L, Roberts JP, et al. "Occult" hepatitis B virus as source of infection in liver transplant recipients. *Lancet* 1994;343:142-146.
113. Marcellin P, Giostra E, Martinot-Peignoux M, Lorient MA, Jaegle ML, Wolf P, et al. Redevelopment of hepatitis B surface antigen after renal transplantation. *Gastroenterology* 1991;100:1432-1434.
114. Sheu JC, Huang GT, Shih LN, Lee WC, Chou HC, Wang JT, et al. Hepatitis C and B viruses in hepatitis B surface antigen-negative hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 1992;103:1322-1327.

115. Topal C, Kaya E, Birge PC, Sayarlıoğlu H, Erdem A, Aydın ND, et al. Sürekli ayaktan periton diyalizi uygulanan hastalarda diyalize başlama şeklinin hepatit sıklığına etkisi. *Tıp Araştırmaları Dergisi* 2003;1:27-29.
116. Svac J, Skladany L, Sekerkova Z, Javorsky P, Leskova L, Mizla P, et al. Peritoneal dialysis is the better therapy choice for successful anti-hepatitis B vaccination. *Adv Perit dial* 2005;21:151-153.
117. Vazquez G, Mendoza L, Alvarez T, Aguilar A, Morales A, Rodriguez F, et al. Comparison of the response to the recombinant vaccine against hepatitis B virus in dialyzed and nondialyzed children with CRF using different doses and routes of administration. *Adv Perit Dial* 1997;13:291-296.
118. Liu YL, Kao MT, Huang CC. A comparison of responsiveness to hepatitis B vaccination in patients on hemodialysis and peritoneal dialysis. *Vaccine* 2005;23:3957-3960.
119. Mitwalli A. Responsiveness to hepatitis vaccine in immunocompromised patients by doubling the dose scheduling. *Nephron* 1996;73:417-420.

## 8. ÖZGEÇMİŞ

1969 yılında Sivas'ta dünyaya geldim. İlkokul, ortaokul ve lise eğitimimi Osmaniye'de aldım. 1987–1994 yılları arasında Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde öğrenim gördüm. 1994-1996 yılları arasında Hacıbektaş Devlet Hastanesi'nde, 1996–1997 yıllarında Elazığ Sağlık Eğitim Merkezi'nde, 1997–2001 yılları arasında Kayseri Ana Çocuk Sağlığı ve Aile Planlaması Merkezi'nde, 2001–2003 yılları arasında ise Elazığ Fevzi Çakmak Sağlık Ocağı'nda pratisyen hekim olarak görev yaptım. 2003 yılında Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda uzmanlık eğitimime başladım. Halen aynı Anabilim Dalında görev yapmaktayım.